

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

EFEITOS IN VITRO DE METABÓLITOS ACUMULADOS NA DEFICIÊNCIA DA  
ACIL-CoA DESIDROGENASE DE CADEIA MÉDIA (MCAD) SOBRE  
PARÂMETROS DO METABOLISMO ENERGÉTICO EM CÓRTEX CEREBRAL  
DE RATOS JOVENS

Tese de Doutorado

Dênis Reis de Assis

Orientador: Prof. Dr. Moacir Wajner

Porto Alegre, 2006.  
Dênis Reis de Assis

EFEITOS IN VITRO DE METABÓLITOS ACUMULADOS NA DEFICIÊNCIA DA  
ACIL-CoA DESIDROGENASE DE CADEIA MÉDIA (MCAD) SOBRE  
PARÂMETROS DO METABOLISMO ENERGÉTICO EM CÓRTEX CEREBRAL  
DE RATOS JOVENS

Tese apresentada ao programa de pós-  
graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
como requisito parcial à obtenção do título de  
Doutor em Bioquímica

Porto Alegre, 2006.

-Podes dizer-me, por favor, que caminho devo seguir para sair daqui?

-Isso depende muito de para onde queres ir - respondeu o gato.

-Preocupa-me pouco aonde ir - disse Alice.

-Nesse caso, pouco importa o caminho que sigas - replicou o gato.

(Lewis Carroll -Alice no País das Maravilhas)

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Moacir Wajner.

Aos Profs. Carlos Severo Dutra-Filho, Clóvis Wannmacher e Ângela Wyse.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

Aos órgãos de fomento à pesquisa CNPq e CAPES.

Aos colegas do Grupo de Erros Inatos do Metabolismo, especialmente do laboratório 38.

Aos colegas do Serviço de genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Aos colegas remadores do rio Guaíba.

À minha querida família e amigos.

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	v
Lista de Figuras e Tabelas.....	vii
Resumo.....	viii
Abstract.....	x
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Defeitos Hereditários da Oxidação de Ácidos Graxos.....	1
1.1.1 Deficiência de MCAD.....	2
1.1.1.1 Achados Patológicos na Deficiência de MCAD.....	4
1.1.1.2 Achados Laboratoriais na Deficiência de MCAD.....	5
1.1.1.3 Patogênese da Deficiência de MCAD.....	5
1.1.1.4 Metabólitos Acumulados nos Pacientes com Deficiência de MCAD.....	6
1.1.1.5 Aspectos Moleculares da Deficiência de MCAD.....	8
1.1.1.6 Tratamento da Deficiência de MCAD.....	9
1.2 Toxicidade dos Ácidos Graxos.....	10
1.3 Modelos Animais em que há Acúmulo de Ácidos Graxos.....	12
1.4 Metabolismo de Ácidos Graxos no Cérebro.....	13
1.5 Atividades Enzimáticas Importantes no Metabolismo Energético Cerebral.....	14
1.5.1 Creatinaquinase.....	14
1.5.2 Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase.....	15
1.5.3 Ciclo de Krebs.....	18
1.5.4 Cadeia Respiratória e Fosforilação Oxidativa.....	21
1.5.4.1 Formação de Radicais Peróxido nos Complexos I e III da Cadeia Respiratória.....	24
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>3. METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>ARTIGO 1</b> - Evidence that antioxidants prevent the inhibition of Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase activity induced by octanoic acid in rat cerebral cortex in vitro.....	27
<b>ARTIGO 2</b> - Inhibition of energy metabolism in cerebral cortex of young rats by the medium-chain fatty acids accumulating in MCAD deficiency.....	37
<b>ARTIGO 3</b> - Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase activity is markedly reduced by cis-4-decenoic acid in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of rats.....	49
<b>4. DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>57</b>
<b>5. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>70</b>
<b>6. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>73</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>74</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP - do inglês adenosine diphosphate (adenosina difosfato)  
ATP - do inglês adenosine triphosphate (adenosina trifosfato)  
CoA, coenzima A  
MCAD - do inglês medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (desidrogenase de acilas de cadeia média)  
CAT - catalase  
cDA - do inglês cis-4-decenoic acid (ácido cis-4-decenóico)  
CNS - central nervous system (sistema nervoso central)  
CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono (gás carbônico)  
CoQ - coenzima Q  
COX - citocromo oxidase  
CK - do inglês creatine kinase (creatinaquinase)  
CKBB - do inglês creatine kinase from brain (creatinaquinase cerebral)  
CK<sub>mi</sub> - do inglês creatine kinase from mitochondrion (creatinaquinase mitocondrial)  
CKMM - do inglês creatine kinase from muscle (creatinaquinase muscular)  
CrP - do inglês creatine phosphate (fosfocreatina)  
CSF - do inglês cerebral spinal fluid (líquido cefalorraquidiano)  
CTPI - carnitina palmitoil transferase I  
CTPII - carnitina palmitoil transferase II  
Cy-CK - do inglês cytosolic creatine kinase (creatinaquinase citosólica)  
DA - do inglês decanoic acid (ácido decanóico)  
DCPIP - do inglês 2,6-dichlorophenol indophenol (indofenol 2,6 diclorofenol)  
EDTA - do inglês ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etileno diaminotetraacético)  
FAD - do inglês flavin adenine dinucleotide (dinucleotídeo de adenina flavina, na forma oxidada)  
FAD(2H) - do inglês flavin adenine dinucleotide (dinucleotídeo de adenina flavina, na forma reduzida)  
FAO - do inglês fatty acid oxidation (oxidação de ácidos graxos)  
GDP - do inglês guanosine diphosphate (guanosina difosfato)  
GSH - glutationa, forma reduzida  
GTP - do inglês guanosine triphosphate (guanosina trifosfato)  
HC - hexanoilcarnitina  
HG - hexanoilglicina  
LCAD - do inglês long-chain acyl-CoA dehydrogenase (desidrogenase de acilas de cadeia longa)  
LCHAD - do inglês long-chain hydroxiacyl-CoA dehydrogenase (Desidrogenase de hidroxiacilas de cadeia longa)  
L-NAME - do inglês L-N (G)-nitro arginine methyl ester (ester de metil L-N (G) nitroarginina)  
Mi-CK - do inglês mitochondrial creatine kinase (creatinaquinase mitocondrial)  
MCFA - do inglês medium-chain fatty acids (ácidos graxos de cadeia média)  
NAD<sup>+</sup> - do inglês nicotinamide-adenine dinucleotide (dinucleotídeo de adenina nicotinamida na forma oxidada)

NADH - do inglês nicotinamide-adenine dinucleotide (dinucleotídeo de adenina nicotinamida na forma reduzida)  
OA - do inglês octanoic acid (ácido octanóico)  
OC - octanoilcarnitina  
PPG - do inglês phenylpropionylglycine (fenilpropionilglicina)  
ROO<sup>-</sup> - radical peroxila  
SCAD - do inglês short-chain acyl-CoA dehydrogenase (desidrogenase de acilas de cadeia curta)  
SDH - do inglês succinate dehydrogenase (sucinato desidrogenase)  
SG - suberilglicina  
SH - grupamento tiólico  
SMSI - Síndrome de morte súbita da infância  
SNC - sistema nervoso central  
SOD - superóxido dismutase (enzima)  
TBA-RS - do inglês, thiobarbituric acid reactive species (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico)  
t-CK - do inglês total creatine kinase (creatinaquinase total)

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### INTRODUÇÃO

Tabela 1: Concentrações dos principais metabólitos acumulados nos pacientes com deficiência de MCAD comparados com indivíduos normais.....	7
Figura 1: Estrutura da Na <sup>+</sup> ,K-ATPase.....	16
Figura 2: Esquema de funcionamento do Ciclo de Krebs.....	21
Figura 3: Fluxo de elétrons através dos quatro complexos da cadeia respiratória.....	23

### METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Artigo 1

Figura 1 :Efeito do OA e DA sobre a atividade da Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase em membrana plasmática sináptica.....	31
Figura 2: Efeito do OA e DA sobre a atividade da Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase em homogeneizados de córtex cerebral de ratos.....	32
Figura 3: Efeito do OA sobre a atividade da Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase em membrana plasmática sináptica e homogeneizados de córtex cerebral de ratos na presença ou ausência de GSH ou trolox.....	32
Figura 4: Efeito dos ácidos oléico e palmítico sobre a atividade da Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.....	33

#### Artigo 2

Figura 1: Efeito do OA, DA e cDA sobre a produção de CO <sub>2</sub> a partir de glicose em córtex cerebral de ratos.....	41
Figura 2: Efeito do OA, DA e cDA sobre a produção de CO <sub>2</sub> a partir de acetato em córtex cerebral de ratos.....	42
Figura 3: Efeito do OA, DA e cDA sobre a produção de CO <sub>2</sub> a partir de citrato em córtex cerebral de ratos.....	42
Figura 4: Efeito do DA sobre as atividades da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos.....	43
Figura 5: Efeito do cDA sobre as atividades da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos.....	43
Figura 6: Efeito do cDA sobre a atividade da t-CK, Cy-CK e Mi-CK em córtex cerebral de ratos.....	44
Figura 7: Efeito dos antioxidantes GSH, vitamina C+E e L-NAME sobre a atividade da t-CK de córtex cerebral de ratos.....	44

#### Artigo 3

Figura 1: Efeito do cDA e OC sobre a atividade da Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase em membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos.....	52
Tabela 1: Efeito da HC, HG, SG e PPG sobre a atividade da Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase em membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos.....	52
Figura 2: Efeito de CAT+SOD, GSH e L-NAME sobre a inibição induzida por cDA sobre a atividade da Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase em membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos.....	53
Figura 3: Efeito do cDA, AO e DA sobre as medidas de quimioluminescência e TBA-RS em córtex cerebral de ratos.....	53



## RESUMO

A deficiência da desidrogenase de acilas de cadeia média (MCAD) é o mais freqüente erro inato da oxidação de ácidos graxos. Os indivíduos afetados por esse distúrbio apresentam-se sintomáticos durante períodos de descompensação metabólica, caracterizado pelo acúmulo de ácidos graxos de cadeia média (AGCM), particularmente os ácidos octanóico (AO), decanóico (AD) e cis-4-decenóico (AcD). Durante as crises, os pacientes apresentam hipoglicemia hipocetótica, hipotonia, rabdomiólise, edema cerebral e, finalmente, entram em coma, podendo ter um desenlace fatal. O tratamento de urgência é baseado na infusão de glicose nos pacientes durante as crises, enquanto uma dieta rica em carboidratos e pobre em gorduras é recomendada nos períodos fora das crises. Uma parte considerável dos pacientes que sobrevivem às crises apresenta um grau variável de manifestações neurológicas. Entretanto, os mecanismos responsáveis pelos sintomas neurológicos da deficiência de MCAD são praticamente desconhecidos. No presente estudo avaliamos a influência dos principais metabólitos acumulados na deficiência de MCAD, os ácidos AO, AD e AcD, e, em alguns casos, também de seus derivados de carnitina e glicina, sobre as atividades de enzimas importantes do metabolismo energético em córtex cerebral de ratos Wistar de 30 dias de vida. AO, AD, AcD e octanoilcarnitina inibiram a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, com ênfase ao AcD, o inibidor mais potente da atividade da enzima. Além disso, verificamos que a co-incubação do AO com glutathiona (GSH) ou trolox (vitamina E solúvel) evitou seu efeito inibitório sobre a atividade da enzima. A inibição da enzima pelo AcD foi também prevenida quando o mesmo foi co-incubado com as enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) juntas, mas não com GSH. Além disso, AO, AD e AcD aumentaram a lipoperoxidação em homogeneizados de córtex cerebral de ratos, medidos por quimioluminescência e TBA-RS. Tais resultados sugerem que esses metabólitos inibiram a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase via radicais livres. Observamos ainda que somente AD e AcD inibiram atividades dos complexos da cadeia respiratória, ao contrário do AO que não teve qualquer ação sobre essas atividades. Enquanto o AD diminuiu somente a atividade do complexo IV a uma

concentração muito alta (3 mM), o AcD diminuiu as atividades dos complexos II, II-III e IV dentro da faixa de concentrações encontrada na deficiência de MCAD (0,25-0,5 mM). Além disso, AO, AD e AcD inibiram a produção de CO<sub>2</sub> a partir de glicose e acetato radiativos como substratos, indicando uma inibição do ciclo de Krebs. No entanto, somente AD e AcD reduziram a produção de CO<sub>2</sub> a partir de citrato, enquanto AO não alterou a mesma. Além disso, nenhum dos três metabólitos testados alterou a atividade da citrato sintase. Demonstramos ainda que o AcD reduziu as atividades da creatinaquinase mitocondrial e citosólica, mas em uma concentração muito alta não encontrada na deficiência de MCAD. Este efeito não foi evitado por GSH, vitamina C+E ou L-NAME, sugerindo que o mesmo deve ter ocorrido via mecanismo distinto do estresse oxidativo. AcD foi o inibidor mais potente das atividades enzimáticas testadas neste trabalho, indicando que deve ser o metabólito de maior toxicidade nesta doença, ao menos no que se refere ao comprometimento do metabolismo energético. Espera-se que nossos resultados possam contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos responsáveis pelos sintomas neurológicos envolvidos na deficiência de MCAD.

## ABSTRACT

Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency is the most frequent inborn error of fatty acid oxidation. The affected individuals are symptomatic after periods of metabolic decompensation, which trigger the accumulation of medium-chain fatty acids (MCFA), particularly octanoic (OA), decanoic (DA), and cis-4-decenoic (cDA) acids. During the crises the patients present hypoketotic hypoglycemia, hypotonia, rhabdomyolysis, cerebral edema, and ultimately became in coma and die. The urgent treatment is based in infusion of glucose to the patients during the crises, while high carbohydrates/low fat diet and oral uptake of L-carnitine during the periods out of the crises are recommended. However, the mechanisms responsible for the neurological symptoms of MCAD deficiency are not still well established. In the present study we evaluated the influence of the main metabolites accumulated in the MCAD deficiency, OA, DA, cDA, and in some cases also of its carnitine and glycine derivatives on the activities of important enzymes of the energy metabolism in cerebral cortex from young Wistar rats. OA, DA, cDA and octanoylcarnitine inhibited the activity of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, with emphasis to cDA, the most potent inhibitor of the enzyme activity. The co-incubation of OA with glutathione (GSH) or trolox (soluble vitamin E) prevented the inhibitory effect of OA on the enzyme activity. We observed the same prevention when cDA was co-incubated with the enzymes catalase (CAT) plus superoxide dismutase (SOD), but not with GSH. Moreover, OA, DA, and cDA increased lipoperoxidation in homogenates from cerebral cortex of rats, measured by chemiluminescence and TBA-RS, suggesting that the tested metabolites affected  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity via free radicals. Only DA and cDA, but not OA, affected the activities of respiratory chain complexes. While DA only decreased the activity of complex IV at a very high concentration, cDA diminished the activities of the complexes II, II-III, and IV at a range of concentrations found in the MCAD deficiency. Furthermore, OA, DA, and cDA inhibited the production of  $\text{CO}_2$  production from radioactive glucose and acetate as substrates. However, only DA and cDA, but not OA reduced  $\text{CO}_2$  production from citrate. None of the three tested fatty acids affected the activity of citrate synthase. We suggest that OA and DA, the

most potent inhibitors of CO<sub>2</sub> production from glucose, could affect the functioning of the glycolysis, and OA, which did not affect respiratory chain or CO<sub>2</sub> production from citrate may affect acetyl-CoA synthase activity. Only cDA reduced creatine kinase activity, but in a very high concentration probably not found in the disease. The effect was not prevented for GSH, vitamin C+E, or L-NAME, suggesting that it may occur via a mechanism distinct of oxidative stress on the enzyme. cDA was the most potent inhibitor of all the enzyme activities tested in this work. Our results may contribute to a better understanding of the mechanisms responsible for the neurological symptoms involved in the MCAD deficiency. To our knowledge, this is the first work to prove that the metabolites accumulated in the MCAD deficiency can impair several steps of the energy metabolism in the brain, and that correlates it with the neurological symptoms present in the MCAD deficiency, especially regarding to the cis-4-decenoic acid, which is pathognomonic of this disease.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Defeitos Hereditários da Oxidação de Ácidos Graxos**

Na década de setenta foram descritas as primeiras doenças atribuídas a defeitos na oxidação dos ácidos graxos em pacientes com astenia ou rabdomiólise induzida por exercício. Pouco tempo depois foi descrita a deficiência sistêmica de carnitina e, entre os anos de 1982 e 1983, a deficiência da desidrogenase da acil-CoA de cadeia média (MCAD) foi diagnosticada em pacientes que apresentavam descompensação metabólica com sintomas neurológicos durante o jejum. Atualmente já estão descritas pelo menos 23 diferentes entidades clínicas dentro deste grupo de doenças (Scriver et al., 2001).

Acredita-se que a prevalência dessas doenças seja subestimada, visto que o diagnóstico delas depende da detecção dos metabólitos acumulados por métodos sofisticados e equipamentos de alto custo que poucos laboratórios possuem (Walker, 1994). Além disso, devido à semelhança do quadro clínico, uma parte considerável dos pacientes é diagnosticada erroneamente como se tivesse sofrido síndrome de morte súbita da infância, infecções bacterianas agudas (septicemia), síndrome de Reye, fígado gorduroso da gravidez ou síndrome de vômito cíclico (Rinaldo et al., 1988).

Os defeitos de oxidação de ácidos graxos podem ocorrer em diferentes etapas da oxidação de ácidos graxos, incluindo o ciclo da carnitina (no transporte da carnitina, na carnitina-palmitoil transferase I (CPTI), na translocase de carnitina/acilcarnitina ou na carnitina-palmitoil transferase II (CPTII) ou a espiral de  $\beta$ -oxidação (nas desidrogenases de acil-CoA de cadeia longa (LCAD), na

desidrogenase de hidroxiacil-CoA de cadeia longa (LCHAD), na desidrogenase de acil-CoA de cadeia média (MCAD), na desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta (SCAD) ou na 2,4-dienoil-CoA redutase). Tendo em vista que a deficiência de MCAD é o mais freqüente destes distúrbios (freqüência aproximada de 1: 10.000 recém-nascidos), a presente investigação estudou o efeito dos metabólitos acumulados nesta doença sobre alguns parâmetros do metabolismo energético. Assim, descreveremos a seguir os vários aspectos da doença.

### **1.1.1 Deficiência de MCAD**

A deficiência de MCAD apresenta-se com uma sintomatologia muito variável, que inclui episódios de vômitos e letargia após período de jejum ou infecção viral associada à diminuição da ingestão oral. Durante as crises mais graves ocorre coma seguido de hipoglicemia hipocetótica, bem como de hiperamonemia com disfunção hepática. A doença usualmente se manifesta no primeiro ano de vida, mas pode se apresentar em qualquer idade (Ruitenbeek et al., 1995).

Uma pesquisa realizada com 63 crianças portadoras de deficiência de MCAD revelou que 19% delas morreram em seu primeiro episódio. Acredita-se que o risco de sofrer uma crise fatal estende-se por toda a vida. Estudos também apontam que aproximadamente 37% dos sobreviventes aos episódios apresentam resultados anormais em testes de desenvolvimento. Assim, 21% apresentam incapacidade de desenvolvimento normal, 21% apresentam atraso na fala e linguagem, 15% apresentam problemas comportamentais e deficiência de

atenção. Os pacientes apresentam também fraqueza muscular (17%), paralisia cerebral (10%) e retardo no crescimento (10%) (Scriver et al., 2001).

Semelhantemente a defeitos hereditários nos complexos da cadeia respiratória, miopatia tem sido relatada em todos os defeitos de  $\beta$ -oxidação mitocondrial, exceto na deficiência da 3-hidroxi-metilglutaril-CoA (Darras & Friedman, 2000). Em outro trabalho, envolvendo 20 pacientes, verificou-se que 5 deles morreram com idades variando dos 3 dias aos 30 meses de vida, sendo que 8 deles tiveram hipoglicemia acentuada nos primeiros 3 dias de vida. Exceto 5 pacientes, cujos sintomas apareceram no período neonatal, todos os demais sofreram o primeiro episódio da doença entre os 5 e os 30 meses de vida. Ainda no mesmo estudo, os 15 sobreviventes apresentaram posteriormente epilepsia, hemiplagia ou atraso na fala, enquanto alguns não conseguiam acompanhar a escola normalmente (Walker, 1994).

A síndrome de morte súbita da infância (SMSI) é definida como morte infantil repentina cuja anormalidade causadora não pôde ser encontrada. Como em 5 a 7% dos infantes mortos por SMSI foram encontradas alterações nos lipídios hepáticos e como estudos em vítimas e irmãos de vítimas de morte por SMSI demonstraram várias desordens metabólicas, surgiu a suspeita de que desordens na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, principalmente a deficiência de MCAD, por ser o defeito mais comum da via de  $\beta$ -oxidação, poderiam estar associadas à SMSI (Arens et al., 1993).

Já outros estudos envolvendo um grande número de vítimas de SMSI indicam que a prevalência da deficiência de MCAD não é aumentada em crianças

mortas por SMSI (Holton et al., 1991; Penzien et al., 1994; Arens et al., 1993) e que os pacientes com deficiência de MCAD geralmente vão ao óbito após apresentarem episódios com sintomas clínicos definidos (Penzien et al., 1994). Talvez por isso outro estudo demonstrou que fora dos centros de investigação de doenças metabólicas a deficiência de MCAD seria uma importante causa de SMSI (Bennett & Powell, 1994). De fato, nos principais institutos pediátricos de doenças metabólicas têm sido descritos casos de pacientes com sintomas clínicos de letargia e hipotonia no período neonatal e que mais tarde foram diagnosticados como portadores de deficiência de MCAD. É importante enfatizar que tais pacientes devem ser cuidadosamente avaliados e tratados e precauções devem ser tomadas ao nascimento de seus irmãos (Walker, 1994). É relevante mencionar que como a mutação A985G, a mais prevalente da deficiência de MCAD, está presente somente em menos de 1 % dos casos de SMSI é necessário investigar-se também a participação de outras desordens de oxidação de ácidos graxos na necropsia de pacientes que morreram após apresentarem sintomas compatíveis com tais doenças (Opdal & Rognum, 2004).

#### **1.1.1.1 Achados Patológicos na Deficiência de MCAD**

Os principais achados patológicos nos pacientes com deficiência de MCAD incluem edema cerebral, verificado após a morte na maioria dos pacientes. Em muitos casos aparece acúmulo microvesicular de lipídios no fígado similar ao acúmulo observado em pacientes com síndrome de Reye. (Scriver et al., 2001). Também foi relatado o caso de um paciente portador de deficiência de MCAD com rabdomiólise que apresentou na biópsia do músculo vasto medial uma diminuição



das fibras tipo I, bem como acúmulo microvesicular de lipídios entre as miofibrilas e acúmulo de glicogênio (Ruitenbeek et al., 1995).

#### **1.1.1.2 Achados Laboratoriais na Deficiência de MCAD**

É comum encontrar-se na deficiência de MCAD hipoglicemia hipocetótica. Por outro lado, muitos pacientes sintomáticos apresentam níveis de glicose sérica normais, sugerindo que as manifestações da doença no sistema nervoso central não devem ser inteiramente atribuídas à hipoglicemia. Os níveis de amônia e de transaminases podem estar moderadamente elevados no sangue, bem como as concentrações de ácido láctico (Scriver et al., 2001).

#### **1.1.1.3 Patogênese da Deficiência de MCAD**

A síntese diminuída de corpos cetônicos durante o jejum tem sido considerada uma importante consequência metabólica da deficiência de MCAD. Conseqüentemente, os pacientes necessitam utilizar a glicose sangüínea como fonte de energia, ocasionando hipoglicemia. Outra consequência da não-utilização dos ácidos graxos de cadeia média na síntese de corpos cetônicos é o acúmulo de acil-CoA de ácido graxo de cadeia média dentro das mitocôndrias. Eleva-se então a razão acil-CoA:CoA, causando a inibição das enzimas piruvato desidrogenase e  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase que utilizam CoA como substrato. Assim, ocorre diminuição da conversão do piruvato a acetil-CoA e diminuição na velocidade do ciclo de Krebs, visto que a síntese do citrato e a conversão do  $\alpha$ -cetoglutarato a succinil-CoA também estão diminuídas. Além disso, a succinil-CoA

ligase é inibida por octanoato e também por outros intermediários de acil-CoA. Com a baixa produção de acetil-CoA diminui a síntese de citrato. O citrato, por sua vez, é precursor de malato, substância necessária para a produção de glicose, via gliconeogênese, e precursor de malonil-CoA, o principal regulador inibitório da CTPI, enzima responsável pela entrada de ácidos graxos de cadeia longa na mitocôndria. Portanto, a diminuição dos níveis de citrato ocasionada pelo acúmulo do octanoato e outros ácidos graxos na deficiência de MCAD provoca também uma diminuição da gliconeogênese e um aumento da entrada de ácidos graxos de cadeia longa na mitocôndria, o que deve ser um agravante para a hipoglicemia e deve provocar o acúmulo de derivados de acil-CoA graxos nos pacientes (Scriver et al., 2001).

#### **1.1.1.4 Metabólitos Acumulados nos Pacientes com Deficiência de MCAD**

O defeito no catabolismo de ácidos graxos de cadeia média ocasiona o acúmulo de derivados de cadeia média que, principalmente durante os períodos de crise, encontram-se anormalmente aumentados no sangue e outros tecidos, bem como na urina dos pacientes (**tabela 1**).

**Tabela 1:** Concentrações séricas e urinárias dos principais metabólitos acumulados em pacientes com deficiência de MCAD comparados com indivíduos normais.

<b>Metabólito</b>	<b>Indivíduos normais</b>	<b>Pacientes com deficiência de MCAD</b>
<b><u>Sangue</u></b> (em $\mu\text{M}$ )		
ácido octanóico <sup>a</sup>	0-15	22- 672
ácido decanóico <sup>a</sup>	5-43	2-228
ácido-4-cis-decenóico <sup>a</sup>	0-2	34-515
octanoilcarnitina <sup>b</sup>	<0,22	0,33-28,3
hexanoilcarnitina <sup>b</sup>	<0,21	0,13-4
decanoilcarnitina <sup>b</sup>	<0,30	0,11-2,6
decenoilcarnitina <sup>b</sup>	<0,04	0,13-1,7
<b><u>Urina</u></b> (em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de creatinina <sup>1</sup> ou $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinina <sup>2</sup> )		
hexanoilglicina <sup>1,c</sup>	0,21-1,9	3,1-653
fenilpropionilglicina <sup>1,c</sup>	0-1,1	1,2-180
suberilglicina <sup>1,c</sup>	0-95	13-4553
ácido adípico <sup>2,d</sup>	-----	1,5-150
ácido subérico <sup>2,d</sup>	-----	0-214

(Fonte: <sup>a</sup>Onkenhout et al., 1995; <sup>b</sup>Chace et al., 1997; <sup>c</sup>Rinaldo et al., 1988; Downing et al., 1989).

Dentre os metabólitos acumulados, o ácido cis-4-decenóico, derivado do ácido linoleico, é considerado composto patognomônico da deficiência de MCAD. A concentração plasmática desta substância em pessoas normais varia entre 0-2  $\mu\text{mol/L}$ , enquanto que nos pacientes sintomáticos varia entre 34-515  $\mu\text{mol/L}$  (Onkenhout et al., 1995).

Outro achado comum na doença é a elevação combinada da concentração urinária de hexanoilglicina, fenilpropionilglicina e suberilglicina nos pacientes (Costa et al., 2000).

#### **1.1.1.5 Aspectos Moleculares da Deficiência de MCAD**

A deficiência de MCAD é uma doença autossômica recessiva cuja mutação mais comum é uma mutação ponto que resulta na substituição de lisina por ácido glutâmico no aminoácido 329 do precursor da MCAD (K329E). Isso ocorre devido à adição de um nucleotídeo adenina (na posição 985) no lugar de guanina no gene da MCAD (c.985A>G). Como essa mutação é responsável por aproximadamente 80-90% dos alelos mutantes em caucasianos, sugere-se que a heterogenicidade clínica observada na doença deve ser atribuída à variação interindividual de vias alternativas para a detoxificação dos ácidos orgânicos que se acumulam na deficiência de MCAD. Deve-se considerar também que o desenvolvimento dos sintomas deve ser influenciado pelo grau de estresse metabólico e a combinação de outros fatores, tais como infecção e jejum (Matsubara, Narisawa & Tada, 1992). Por outro lado, mais recentemente tem-se tentado correlacionar o tipo de mutação envolvida na doença com o acúmulo de

metabólitos nos pacientes, sendo que aparentemente a presença da mutação c.985A>G parece estar correlacionada com maiores níveis de acúmulo neonatal de octanoilcarnitina no plasma quando os pacientes são assintomáticos bem como de acilglicinas na urina. Além disso, as mutações c.985A>G e c.583G>A parecem resultar em maior severidade enquanto que a mutação c.199T>C parece resultar em sintomas menos severos da doença (Waddell et al., 2006).

#### **1.1.1.6 Tratamento da Deficiência de MCAD**

A terapia aplicada aos pacientes com deficiência de MCAD consiste em providenciar uma ingestão adequada de calorias, evitar o jejum e outras situações de catabolismo e ter cuidados especiais durante episódios de infecções (Scriver et al., 2001).

A L-carnitina tem sido administrada em pacientes com doenças metabólicas com acúmulo de ácidos orgânicos como acidemia propiônica, acidemia metilmalônica, acidemia isovalérica, acidemia glutárica tipo II, deficiência de MCAD, síndrome de Reye e outras. A L-carnitina liga-se a ácidos orgânicos permitindo sua excreção na forma de acilcarnitinas. No caso da deficiência de MCAD ocorre a conversão de octanoato para o sistema nervoso central, especialmente no plexo coróide, em octanoilcarnitina, substância que se acredita ser de menor toxicidade e de excreção mais fácil do que o octanoato. Portanto não deve ser surpreendente o fato de se observar deficiência de L-carnitina em portadores de deficiência de MCAD durante as crises (Kim, Dorgan & Roe, 1984; Kim, Roe & Amborse, 1990). Daí a L-carnitina vem sendo testada inclusive no tratamento dos problemas musculares secundários à deficiência de MCAD. Os

resultados iniciais têm demonstrado que o tratamento dos pacientes por 4 semanas com L-carnitina evita a queda dos níveis de carnitina plasmática e aumenta a excreção urinária de acilcarnitinas, além de aumentar a tolerância dos pacientes ao exercício (Lee et al., 2005).

## **1.2 Toxicidade dos Ácidos Graxos**

Samson, Dahl & Dahl (1956) descreveram ação narcótica *in vivo* de ácidos graxos de cadeia curta e verificou que tal ação aumenta conforme o comprimento da cadeia carbonada e diminui com a adição de grupamentos hidroxila (–OH) ou carboxila (–COOH).

Durante as últimas décadas tem sido demonstrado que os ácidos graxos de cadeia longa, bem como seus derivados de CoA, são inibidores de enzimas-chave envolvidas em processos como a glicólise, gliconeogênese e síntese de ácidos graxos. Verificou-se que parte dos efeitos é devido à propriedade detergente destes compostos, visto que a presença de insaturações e de cadeias carbonadas maiores, além de aumentar o poder de detergência dos mesmos aumenta seus efeitos sobre essas vias metabólicas (Pande & Mead, 1968). Posteriormente, foi observado um efeito inibitório das acilas palmitoil-CoA e estearil-CoA sobre a translocase adenina nucleotídeo, quando adicionadas a um meio contendo mitocôndrias isoladas de coração de ratos (Pande & Blanchaer, 1971). Em outro estudo envolvendo mitocôndrias isoladas de fígado e coração de ratos, foi verificado um aumento no consumo de O<sub>2</sub> ocasionado pela adição de palmitoil-CoA não relacionado à detergência, pois tal efeito foi revertido pela adição de L-carnitina levando as membranas mitocondriais a apresentarem ultraestrutura

normal no exame microscópico (Wood et al.,1977). Outros investigadores demonstraram uma inibição da fosforilação oxidativa causada pela presença de palmitoil-CoA em culturas de fibroblastos humanos permeabilizados por digitonina, sendo também sugerido que a palmitoil-CoA seria capaz de inibir a translocase adenina nucleotídeo (Ventura et al., 1995).

Também foi demonstrado que hexanoato, palmitato, oleato e octanoato causam um aumento do consumo de O<sub>2</sub> e produção de CO<sub>2</sub> sem causar um correspondente aumento na produção de ATP em fígado de rato (Scholz, Schwabe & Soboll, 1984; Berry et al., 1983). Além deste, outros efeitos têm sido atribuídos ao octanoato, quando testado *in vitro*, como inibição do controle do volume de astrócitos e da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase em cultura de células gliais (Olson et al., 1989), que poderiam estar relacionados ao edema cerebral observado em doenças como deficiência de MCAD e síndrome de Reye, ambas caracterizadas por acúmulo de octanoato nos tecidos dos pacientes afetados. Foi também demonstrado que octanoato e decanoato são inibidores do transporte de ácidos orgânicos através do plexo coróide em coelhos. Os autores do trabalho sugeriram que tal efeito poderia impedir a depuração do octanoato e compostos relacionados, contribuindo para o acúmulo desses compostos no cérebro e no fluido cerebrospinal, contribuindo para a encefalopatia das doenças em que essas substâncias se acumulam (Kim et al., 1983).

Outros estudos demonstraram que a inibição da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase de rim de coelhos (Swarts et al., 1990) e a inibição da Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>-ATPase de eritrócitos humanos (Davis et al., 1987) por ácidos graxos aumentam com o comprimento de cadeia e na presença de insaturações nestes compostos.

Finalmente, vasodilatação (Ellis et al., 1990) e inibição da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Amruthesh, Falkj & Ellis, 1992) foram medidos e atribuídos ao ácido araquidônico e seus metabólitos, provavelmente pela capacidade dos mesmos de produzir radicais livres. Tal possibilidade parece ser bastante viável, levando-se em conta que mais recentemente foi demonstrada a inibição da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em homogenizado de cérebro de ratos causada por um sistema artificial de produção de radicais livres (Tsakiris et al., 2000).

### **1.3 Modelos Animais de Doenças em que há Acúmulo de Ácidos Graxos**

O primeiro modelo animal de acúmulo sanguíneo de octanoato foi obtido através da infusão deste ácido graxo em coelhos com o objetivo de simular nos animais sintomas da síndrome de Reye (Trauner & Huttenlocher, 1978, Trauner, 1982). De fato, os animais apresentavam algumas das anormalidades clínicas e bioquímicas observadas em pacientes com esta encefalopatia hepática, como hiperventilação, hiperamonemia e depósito de gordura no fígado. Algumas alterações foram também observadas no cérebro das cobaias. Posteriormente, foi descrita a inibição da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em diferentes regiões cerebrais dos animais injetados com octanoato. Tal efeito passou a ser considerado como um possível mecanismo causador da encefalopatia observada na síndrome de Reye, uma vez que as concentrações plasmática e cerebral de octanoato atingida nos coelhos foram similares àquelas encontradas nos pacientes com a doença (Trauner, 1980).

Foram também investigados os efeitos da infusão aguda de octanoato em camundongos sobre as concentrações cerebrais de alguns metabólitos envolvidos



com o metabolismo energético quando os animais estavam nos estados de pré-coma ou coma. Alterações nas concentrações de glicose, glicogênio, ATP e fosfocreatina foram encontradas apenas na formação reticular do cérebro dos animais, enquanto as concentrações destas mesmas substâncias em outras estruturas cerebrais foram normais (McCandless, 1985).

Em outras investigações, com o intuito de mimetizar um defeito na oxidação de ácidos graxos, foram empregados inibidores específicos das desidrogenases de acil-CoA *in vivo*, como os ácidos espiropentaneacético (Tserng, Jin & Hoppel, 1991), e 2-mercaptoacetato em ratos, (Bauché et al., 1981) ou o 2-mercaptoacetato em camundongos (Del Prete et al., 1998), assim como derivados da 2-alquinoil CoA foram empregados *in vitro* em enzimas extraídas de rins de porcos (Freund et al., 1985).

#### **1.4 Metabolismo de Ácidos Graxos no Cérebro**

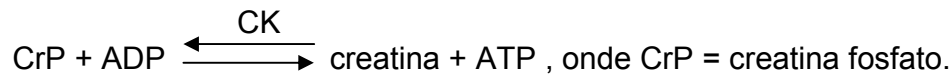
Há evidências de que tanto o cérebro humano como o de rato são capazes de oxidar ácidos graxos e utilizá-los como fonte de energia. Curiosamente a enzima octanoil-CoA desidrogenase possui uma atividade muito maior do que a da desidrogenase da palmitoil-CoA em tecido cerebral, distintamente do que ocorre em outros tecidos. Pensa-se, inclusive, que tal diferença de atividade poderia fazer parte de um mecanismo adaptativo para proteger o cérebro de possíveis efeitos tóxicos do octanoato e de outros ácidos graxos de cadeia média potencialmente tóxicos ao cérebro (Reichmann, Maltese & de Vivo, 1988).

Por outro lado, os ácidos monocarboxílicos podem sofrer  $\omega$ -oxidação no cérebro originando ácidos dicarboxílicos. (Alexander, Snyder & Tonsgard, 1998).

## 1.5 Atividades Enzimáticas Importantes no Metabolismo Energético Cerebral

### 1.5.1 Creatinaquinase

A enzima creatinaquinase (CK) catalisa a seguinte reação:



A creatina quinase (CK, E.C. 2. 7. 3. 2) está presente em grandes quantidades em tecidos que requerem altas quantidades de energia, como os músculos esquelético e cardíaco e o cérebro. Foram identificadas cinco isoformas de CK, sendo duas delas mitocondriais (CK<sub>mi</sub>) e três citoplasmáticas, CKBB (predominante em cérebro), CKMM (predominante em músculo esquelético adulto) e CKMB (predominante em músculo cardíaco) (Manos, Bryan & Edmond, 1991; Molloy et al., 1992).

A função da CK<sub>mi</sub> está associada à exportação de energia das mitocôndrias para o citosol da célula. O estado octamérico da CK<sub>mi</sub> é essencial para essa enzima também para a proteção da abertura do póro de transição de permeabilidade mitocondrial (Soboll et al., 1999).

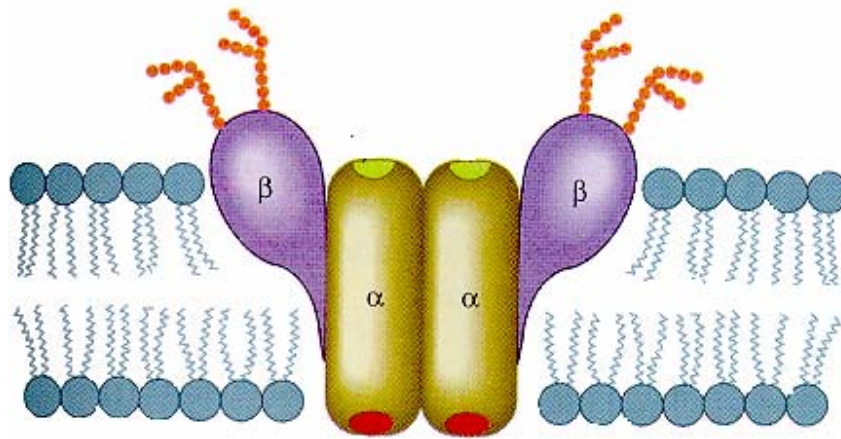
Acredita-se que as creatinaquinasas mitocondriais e citosólicas atuem de forma sincrônica na transferência de energia nos locais de maior demanda de ATP. A creatinafosfato produzida dentro das mitocôndrias pelas CK<sub>mi</sub> regenera ATP em sítios citoplasmáticos de alto consumo de ATP transformando-se em

creatina. Provavelmente tal função é exercida via associação das CKs com ATPases celulares específicas, como as bombas responsáveis por manter gradientes iônicos (Molloy et al., 1992; Kaldis et al., 1996). De fato, foram encontradas, em determinadas regiões do cérebro ricas em mitocôndrias, grandes quantidades de CK<sub>mi</sub> juntamente com CKBB, o que confirmaria esta hipótese (Kaldis et al., 1996).

Recentemente tem sido demonstrado que a CK<sub>mi</sub> é susceptível à inativação por peroxinitrito, produto que se acumula em diversas doenças neurodegenerativas e reage com os grupos tióis da enzima (Stachoviak et al., 1998), o que justificaria a diminuição da atividade dessa enzima encontrada em pacientes com algumas neuropatologias, tais como a doença de Alzheimer (Aksenov et al., 2000) e episódios de isquemia (Soboll et al., 1999), ambas caracterizadas pelo envolvimento de estresse oxidativo.

### **1.5.2 Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase**

A Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase é uma proteína transmembrana constituída por dois tipos de subunidades, a subunidade  $\alpha$ , de 110 kD e não-glicosilada que contém os sítios de atividade catalítica da enzima e de ligação de íons, e a subunidade  $\beta$ , que é uma glicoproteína de 55 kD de função desconhecida, formando uma estrutura dimérica ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub>.

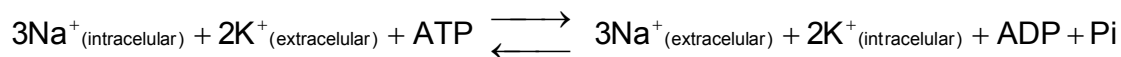


**Figura 1:** Estrutura da  $\text{Na}^+$ ,K-ATPase (Fonte:Voet & Voet, 1995).

A função desta enzima é translocar  $\text{Na}^+$  (muito mais concentrado fora do que dentro da célula) e  $\text{K}^+$  (muito mais concentrado dentro do que fora da célula), através da membrana plasmática, contra seus gradientes de concentração utilizando energia (ATP). A enzima transporta simultaneamente 3  $\text{Na}^+$  para fora e 2  $\text{K}^+$  para dentro da célula. A saída de  $\text{Na}^+$  capacita as células animais a controlar osmoticamente seu conteúdo de água. Como três cargas positivas são transportadas para o meio extracelular e apenas duas para o meio intracelular, o fluxo de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  produz um gradiente eletroquímico através da membrana celular (Lingrel & Kuntzweiler, 1994), que é usado como fonte de energia para a despolarização e repolarização do potencial de membrana, manutenção e regulação do volume celular, transporte ativo, transporte dependente de  $\text{Na}^+$ , de glicose, de aminoácidos e de neurotransmissores e cotransporte/antiporte de outros íons (Geering, 1990). Enfatiza-se que todas as células eucarióticas superiores consomem grandes quantidades do ATP por elas produzido para a

manutenção das concentrações citosólicas de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, sendo que o consumo chega a ser de 40 a 60% nas células neuronais (Whittan, 1962).

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



Alterações nos mecanismos que mantêm o equilíbrio entre a taxa de sódio e potássio intra e extraneuronal podem ter conseqüências graves para as células do SNC (Erecnska & Silver, 1994) tendo sido associadas com despolarização excessiva, instabilidade da membrana e descargas paroxísticas (Donaldson et al., 1977).

O efeito de radicais livres sobre a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase tem sido enfatizado como a principal fonte de dano celular na isquemia seguida de reperfusão do miocárdio. Estudos *in vitro* têm demonstrado uma inibição da enzima quando exposta a radicais hidroxila (Hitschke et al., 1994) e também quando exposta a sistemas artificiais produtores de radicais livres em homogenizado de cérebro de ratos (Tsakiris et al., 2000).

Por outro lado, a inibição da atividade da enzima tem sido associada a diversas patologias neurológicas (Renkavec et al., 1992; Grisar, 1984; Bem-Ari, 1985; Choi & Rothman, 1990; Cousin, Nicholls & Pockoc, 1995; Lees & Leong, 1995)

Além disso, Hanglund e colaboradores (1985) demonstraram que uma menor atividade da enzima Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase em algumas regiões cerebrais parece estar relacionada a episódios convulsivos, talvez refletindo uma menor atividade na regulação do potássio extracelular. Rapport e colaboradores (1975)

encontraram uma diminuição de 60% na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em córtex cerebral obtido de um paciente que apresentava convulsões generalizadas intratáveis. Além disso, a inibição da enzima está associada à liberação de neurotransmissores em uma variedade de preparações neuronais (Jacobson et al., 1986).

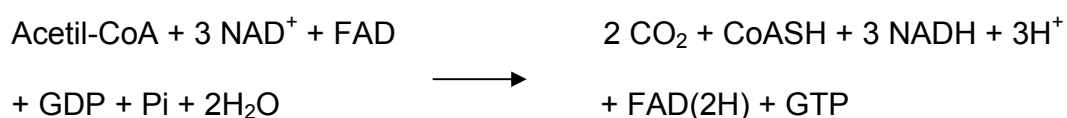
Através de estudos dos efeitos *in vivo* da administração de fenilalanina sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase de córtex cerebral de ratos, Wyse e colaboradores (1995) demonstraram que na hiperfenilalaninemia experimental produzida pela administração crônica de fenilalanina ocorre uma diminuição significativa na atividade específica da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Posteriormente, foi demonstrado também que tanto a administração crônica de ácido propiônico como a presença deste ácido no meio de incubação inibem a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em córtex cerebral de ratos (Wyse et al., 1998). Silva e colaboradores (1999) demonstraram ainda que o íon amônio, a citrulina, o ácido arginínico, a N-acetilarginina, a homoarginina e os três últimos metabólitos combinados diminuem significativamente a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase quando testados *in vitro*. Tais resultados poderiam ser relevantes na explicação dos sintomas neurológicos apresentados por pacientes com citrulinemia e argininemia.

### **1.5.3 Ciclo de Krebs**

Enquanto organismos anaeróbicos obtêm energia via fermentação de piruvato a ácido carboxílico ou álcool, a maioria dos organismos eucarióticos, principalmente os pluricelulares, obtêm energia através da conversão de piruvato a  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CO}_2$ , um processo bem mais elaborado. Isto só é possível graças a uma

via cuja fase aeróbica é conhecida como respiração celular. O processo completo dá-se em três etapas: (1) moléculas combustíveis, como glicose, ácidos graxos e alguns aminoácidos são convertidos a acetil-CoA; (2) os grupos acetil entram no ciclo de Krebs e são enzimaticamente convertidos a CO<sub>2</sub>. A energia obtida é conservada nos carreadores de elétrons reduzidos NADH e FAD(2H) e (3) NADH e FAD(2H) sofrem oxidação liberando prótons e elétrons. (Nelson & Cox, 2005).

No ciclo de Krebs a fonte de carbonos para o CO<sub>2</sub> e de elétrons para serem transferidos para NAD<sup>+</sup> e FAD é a acetil-CoA, que é oxidada em uma série de reações cuja equação resultante é a seguinte:

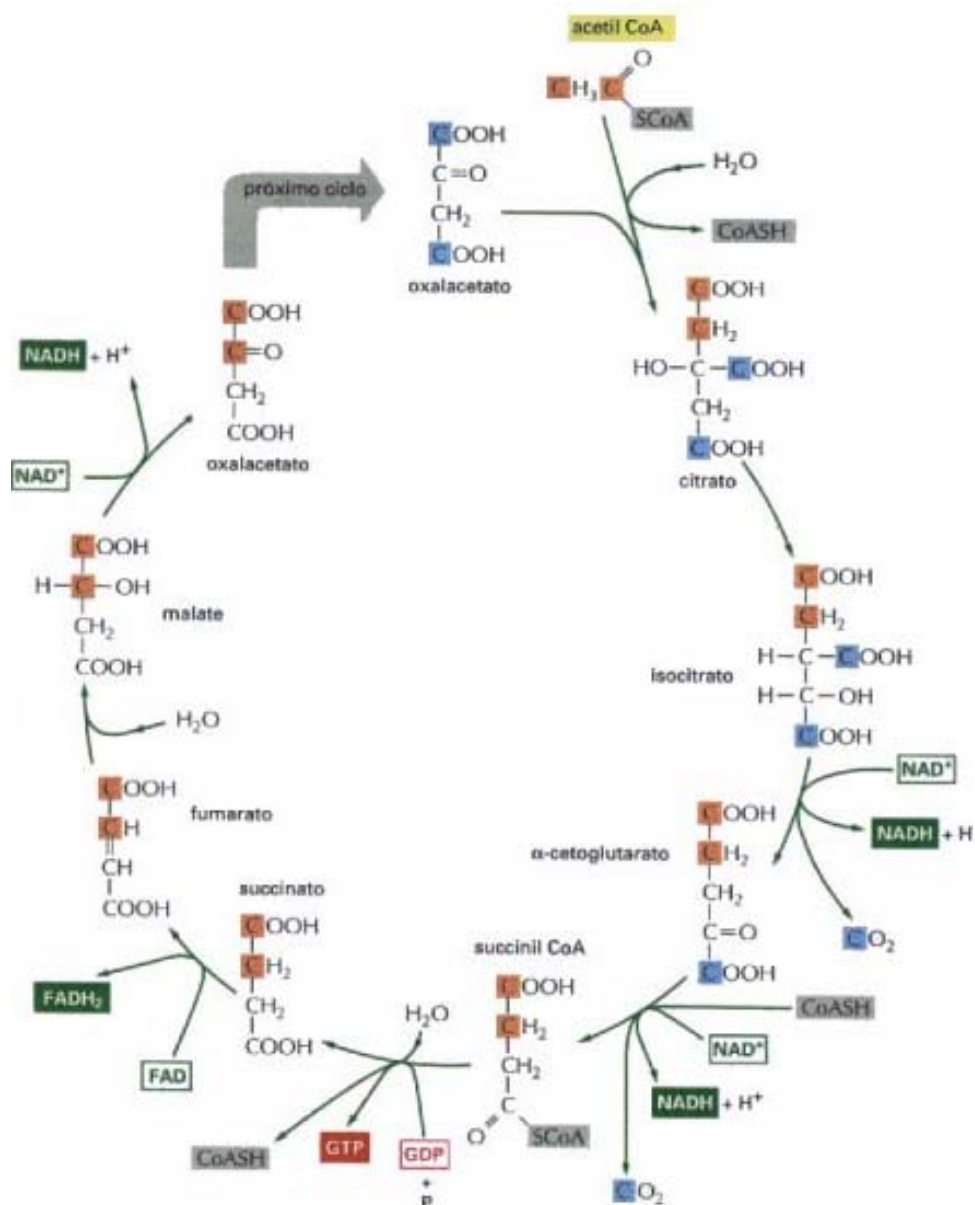


Portanto, uma molécula de acetil-CoA origina 3 NADH, 1 FAD(2H) e 1 GTP, compostos ricos em energia. Quando NADH e FAD(2H) são reoxidados na cadeia respiratória aproximadamente 3 ATP são gerados para cada NADH e 2 ATP para cada FAD(2H). Portanto o ciclo de Krebs em conjunto com a fosforilação oxidativa produzem 12 ligações de fosfato de alta energia a partir de cada grupo acetil oxidado (Marks, Mrks & Smith, 1996; Berg, Timoczco & Stryer, 2004).

No ciclo de Krebs a acetil-CoA combina-se com oxaloacetato numa reação catalisada pela citrato sintase, originando citrato. Em uma segunda etapa o citrato é convertido pela aconitase ao seu isômero isocitrato. Este último composto é substrato da isocitrato desidrogenase e sofre a primeira oxidação do ciclo, reduzindo NAD<sup>+</sup> a NADH e originando α-cetoglutarato com liberação de CO<sub>2</sub>.

Novamente ocorre oxidação-redução, quando a  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase catalisa a oxidação do  $\alpha$ -cetoglutarato na presença de  $\text{NAD}^+$  e CoA, gerando succinil-CoA, NADH e liberando mais uma molécula de  $\text{CO}_2$ . Na etapa seguinte a succinato tioquinase faz a retirada da CoA da succinil-CoA e a fosforilação de uma molécula de GDP, produzindo GTP, CoA e succinato. A terceira reação de oxidação-redução do ciclo de Krebs ocorre em seguida com a oxidação de succinato a fumarato e redução de FAD a  $\text{FAD}(2\text{H})$ , catalisada pela succinato desidrogenase, enzima que participa também da cadeia respiratória. A próxima etapa é uma hidratação, catalisada pela fumarase convertendo fumarato a malato. Finalmente ocorre a quarta e última reação de oxidação-redução do ciclo de Krebs, com a oxidação de malato a oxaloacetato e redução de  $\text{NAD}^+$  a NADH, catalisada pela malato desidrogenase (Marks, Marks & Smith, 1996) (**Figura 2**).





**Figura 2:** Esquema de funcionamento do Ciclo de Krebs (Fonte: Alberts et al., 1997).

### 1.5.4 Cadeia Respiratória e Fosforilação Oxidativa

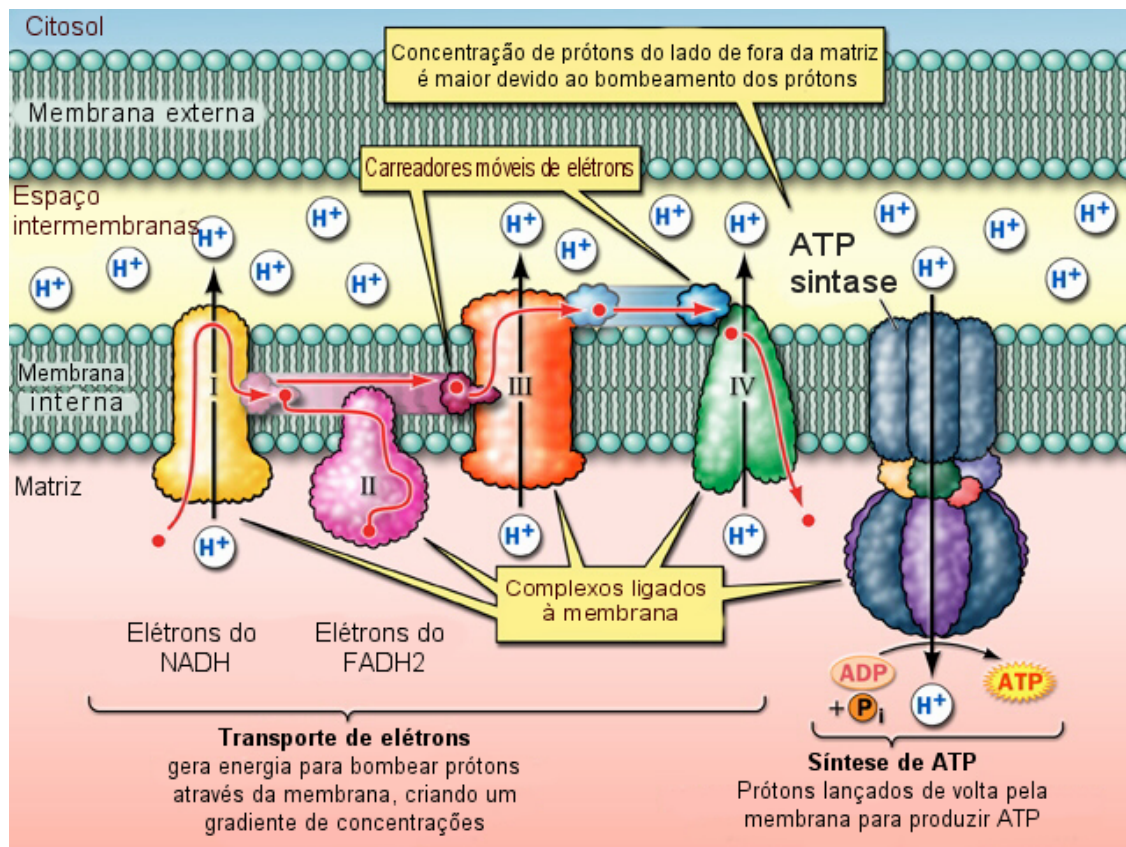
A fosforilação oxidativa, constituída pelo processo acoplado da transferência de elétrons pela cadeia respiratória e pela fosforilação do ADP, é

responsável pela síntese de quase todo o ATP gerado nas células (Marks, Marks & Smith, 1996).

O destino dos elétrons do NADH e FAD(2H) originados no ciclo de Krebs é a cadeia respiratória, que é constituída por uma seqüência de carreadores de elétrons, que em sua maioria são ligados a proteínas inseridas na membrana mitocondrial interna e que recebem elétrons de estruturas próximas reduzidas e os transferem a estruturas oxidadas, até chegarem ao acceptor final, o O<sub>2</sub>. Tal processo fornece energia para o bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermediário entre as membranas interna e externa da mitocôndria. Segundo a teoria quimiosmótica, esta diferença de concentração de prótons origina um potencial eletroquímico que garante a fosforilação oxidativa do ADP no momento em que os prótons retornam à matriz mitocondrial (Marks, Marks & Smith, 1996) (**Figura 3**).

Os componentes da cadeia respiratória são os seguintes: NADH desidrogenase (complexo I), succinato desidrogenase (complexo II), complexo citocromo b-c<sub>1</sub> (complexo III) e citocromo oxidase (COX) (complexo IV). A cadeia respiratória possui também dois transportadores móveis de elétrons entre os complexos, que são a coenzima Q (CoQ), entre os complexos I e III, e o citocromo c, entre os complexos III e IV (Nelson & Cox, 2005). O bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço entre as membranas externa e interna (espaço intermembranas) da mitocôndria ocorre simultaneamente com o transporte de elétrons entre NADH e CoQ (catalisado pelo complexo I – NADH desidrogenase) e entre CoQ e citocromo c (catalisado pelo complexo III – complexo citocromo b-c<sub>1</sub>). A cada ciclo a CoQ recebe 2 prótons e 2 elétrons da

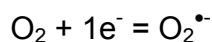
matriz mitocondrial. Em seguida, esta coenzima transporta os prótons para o espaço intermembranas da mitocôndria, enquanto doa um elétron de volta para o outro componente do complexo citocromo b-c<sub>1</sub> e outro para a COX, que também bombeia prótons para fora da matriz mitocondrial, contribuindo para o aumento do gradiente de prótons entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembranas. O complexo II da cadeia respiratória (sucinato desidrogenase) é o único que não atua diretamente como bomba de prótons e participa diretamente do ciclo de Krebs (Nelson & Cox, 2005; Marks, Marks & Smith, 1996).



**Figura 3:** Fluxo de elétrons através dos quatro complexos da cadeia respiratória. O gradiente eletroquímico transmembrana formado é utilizado pela ATP-sintase para a síntese de ATP (adaptado de Nelson & Cox, 2005).

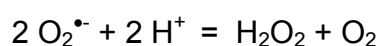
### 1.5.4.1 Formação de Radicais Peróxido nos Complexos I e III da Cadeia Respiratória

Como ubiquinona reduzida doa elétrons diretamente ao oxigênio molecular, então ocorre a formação do ânion peróxido, da seguinte maneira:

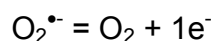
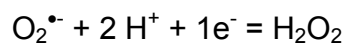


O ânion superóxido é um radical livre capaz de provocar dano oxidativo às mitocôndrias e seu ambiente. A produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  aumenta com o aumento do  $\Delta\Psi$ , variando de 0,1% a 4% do consumo total de oxigênio. Essas espécies são retidas pelo complexo IV evitando a liberação de superóxido. O ânion superóxido é gerado no sítio ligador de quinona, externo do complexo III e é liberado para dentro do espaço intermembranas da mitocôndria.

Uma superóxido dismutase citosólica CuZn dependente (SOD 1) detoxifica o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  citoplasmático por dismutação em peróxido de hidrogênio e água. A matriz mitocondrial possui uma outra superóxido dismutase que contém manganês (Mn-SOD ou SOD 2). Ambas isoformas catalisam a seguinte reação:



As duas meias reações são as seguintes:



Por outro lado, acredita-se que o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  pode também ser formado na matriz mitocondrial através do complexo I. Ao contrário da produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  pelo complexo III, a produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  pelo complexo I é independente do  $\Delta\Psi$  (Nicholls & Ferguson, 2002).

## 2. OBJETIVOS

**Geral.** Estudar os efeitos *in vitro* principais metabólitos acumulados na deficiência de MCAD sobre importantes atividades enzimáticas envolvidas no metabolismo energético em córtex cerebral de ratos jovens.

### **Artigo 1.**

- A)** Estudar os efeitos *in vitro* dos ácidos octanóico e decanóico sobre a atividade da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase em homogeneizado total e membrana sináptica plasmática de córtex cerebral de ratos.
- B)** Investigar os mecanismos envolvidos no efeito causado pelo ácido octanóico sobre a atividade da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase em homogeneizado total e membrana sináptica plasmática de córtex cerebral de ratos.
- C)** Estudar e comparar os efeitos dos ácidos octanóico e decanóico com os possíveis efeitos de ácidos graxos de cadeia longa insaturada (oléico) e de cadeia longa e saturada (palmítico) sobre a atividade da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase em homogeneizado total de córtex cerebral de ratos.

### **Artigo 2.**

- A)** Estudar os efeitos *in vitro* dos ácidos graxos de cadeia média acumulados na deficiência de MCAD (octanóico, decanóico e cis-4-decenóico) sobre a produção de CO<sub>2</sub>, bem como sobre as atividades dos complexos da cadeia

respiratória e da creatinaquinase em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

**B)** Estudar os mecanismos responsáveis pelos efeitos dos metabólitos testados, especialmente sobre a inibição da creatinaquinase.

**Artigo 3.**

**A)** Estudar os efeitos *in vitro* do ácido cis-4-decenóico, bem como de alguns compostos derivados da combinação de ácidos graxos de cadeia média com carnitina ou glicina (hexanoilcarnitina, octanoilcarnitina, hexanoilglicina, suberilglicina e 3-fenilpropionilglicina) sobre a atividade da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase em membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos.

**B)** Avaliar possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos encontrados.

### 3. METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### *Artigo 1*

Evidence that antioxidants prevent the inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by octanoic acid in rat cerebral cortex in vitro

*Dênis R. de Assis, César A. J. Ribeiro, Rafael B. Rosa, Patrícia F. Schuck, Karina B. Dalcin, Carmen R. Vargas, Clóvis M. D. Wannmacher, Carlos S. Dutra-Filho, Ângela T. S. Wyse, Paz Briones, Moacir Wajner.*

*Neurochemical Reseach, 28(8): 1255-1263, 2003*

**Artigo 2**

Inhibition of energy metabolism in cerebral cortex of young rats by the medium-chain fatty acids accumulating in MCAD deficiency

*Dênis R. de Assis, Rita de C. Maria, Rafael B. Rosa, Patrícia F. Schuck, César A. J. Ribeiro, Gustavo da C. Ferreira, Carlos S. Dutra-Filho, Ângela T. S. Wyse, Clóvis M. D. Wannmacher, Marcos L. S. Perry, Moacir Wajner.*

*Brain Research, 1030: 141-151, 2004.*



**Artigo 3**

Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity is markedly reduced by cis-4-decenoic acid in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of rats

*Dênis R. de Assis, Rita C. Maria, Gustavo C. Ferreira, Patrícia F. Schuck, Alexandra Latini, Carlos S. Dutra-Filho, Clóvis M. D. Wannmacher, Ângela T. S. Wyse, Moacir Wajner.*

*Experimental Neurology* **197**(1):143-149, 2006.

#### 4. DISCUSSÃO GERAL

Pacientes afetados pela deficiência de MCAD apresentam clinicamente episódios de vômitos e letargia e/ou coma, acompanhados algumas vezes por hipoglicemia hipocetótica, bem como acidemia láctica e hiperamonemia com disfunção hepática. Podem também apresentar rabdomiólise e fraqueza muscular, o que sugere disfunção mitocondrial (Ruitenbeek et al., 1995). Durante as crises ocorre o aumento nas concentrações teciduais e nos líquidos biológicos de vários metabólitos, incluindo-se os ácidos octanóico (C8:0), decanóico (C10:0) e 4-cis-decenóico (C10:1), os tioésteres de cadeia média derivados da CoA hexanoil (C6:0), octanoil (C8:0), octenoil (C8:1), decanoil (C10:0) e 4-cis-decenoil (C10:1) (Scriver et al., 2001; Onkenhout et al., 1995; Martinez et al., 1997) e também os ésteres derivados da L-carnitina hexanoilcarnitina, octanoilcarnitina, decanoilcarnitina e decenoilcarnitina (Schmidt-Sommerfeld et al., 1992; Walker, 1994; Chace et al., 1997).

Apesar de hipoglicemia e hiperamonemia serem encontrados em pacientes afetados pela deficiência de MCAD durante as crises de descompensação metabólica, possivelmente essas alterações laboratoriais não expliquem os danos neurológicos encontrados nos pacientes, visto que não há relação entre os episódios encefalopáticos e a hipoglicemia e/ou a hiperamonemia apresentada pelos pacientes (Stanley et al., 1983). Por outro lado, tendo em vista que um número considerável de estudos demonstrou ações tóxicas *in vivo* e *in vitro* de ácidos graxos sobre vários tecidos (ver item 1.2 da introdução), postula-se que os achados neurológicos na deficiência de MCAD podem ser devidos ao aumento

das concentrações dos ácidos graxos e/ou de seus derivados acumulados nos pacientes durante as crises. Considerando ainda que os pacientes afetados por essa doença excretam concentrações elevadas de ácido láctico e apresentam alterações musculares compatíveis com mitocondriopatia, no presente trabalho estudamos a influência dos principais ácidos graxos acumulados na deficiência de MCAD (ácidos octanóico, decanóico e cis-4-decenóico) e também de alguns de seus derivados (octanoilcarnitina, hexanoilcarnitina, hexanoilglicina, suberilglicina e fenilpropionilglicina) sobre diversos parâmetros do metabolismo energético cerebral de ratos *in vitro* numa tentativa de compreender melhor a fisiopatogenia envolvida na encefalopatia apresentada pelos pacientes com deficiência de MCAD durante as crises.

Inicialmente testamos a influência do ácido octanóico sobre as atividades dos complexos da cadeia respiratória (I–IV) e creatinaquinase em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens, bem como a influência dos ácidos octanóico e decanóico sobre a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase (em homogeneizado total e em membrana plasmática sináptica isolada). Os resultados mostraram que o ácido octanóico não alterou as atividades dos complexos da cadeia respiratória bem como da creatinaquinase, mesmo em concentrações elevadas (1 e 3 mM). Por outro lado, os ácidos octanóico e decanóico significativamente inibiram a atividade da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase em homogeneizado total e em membrana plasmática sináptica, sendo o efeito mais pronunciado no segundo tipo de preparação. Em seguida testamos a influência dos antioxidantes glutathiona (GSH), protetor de grupos -SH da enzima que atua diretamente como agente redutor dos grupamentos tióis (Meister & Anderson,

1983) e trolox ( $\alpha$ -tocoferol, vitamina E hidrossolúvel), excelente agente seqüestrador de radicais peroxila ( $\text{ROO}^-$ ) (Burton et al., 1990) sobre os efeitos inibitórios causados pelo ácido octanóico sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, visto que esta enzima é vulnerável a ataques por radicais livres (Hitschke et al., 1994). O efeito inibitório do ácido octanóico foi completamente abolido por trolox e parcialmente por GSH quando adicionados ao meio de incubação, tanto em homogeneizado total como na preparação de membrana sináptica plasmática. Isso sugere que a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase teve sua atividade diminuída por dano oxidativo do ácido octanóico sobre grupamentos da enzima, com especial ênfase para os grupamentos tióis (-SH), ou via radicais livres causando lipoperoxidação na membrana plasmática onde a enzima está inserida e afetando a mesma indiretamente (Tsakiris et al., 2000).

Testamos também o efeito dos ácidos palmítico e oléico (saturado e insaturado, respectivamente) sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase como medida de comparação. Observamos um potente efeito inibitório causado pelo oleato sobre a enzima. Esses resultados nos fizeram pensar que o ácido cis-4-decenóico, composto patognomônico que se acumula na deficiência de MCAD, que é um ácido graxo insaturado, poderia ter um efeito inibitório significativo sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Seguindo esta linha de raciocínio, testamos a influência do ácido cis-4-decenóico, e também dos compostos octanoilcarnitina, hexanoilcarnitina, hexanoilglicina, suberilglicina e 3-fenilpropionilglicina, que se encontram acumulados na deficiência de MCAD, sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase em membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos jovens. O

ácido cis-4-decenóico inibiu em aproximadamente 40% a atividade da enzima a partir da concentração de 0,25 mM, mais de 60% na concentração de 0,5 mM e 100 % na concentração de 1 mM. Por outro lado, a hexanoilcarnitina, hexanoilglicina, suberilglicina e 3-fenilpropionilglicina não alteraram a atividade da enzima, enquanto o composto octanoilcarnitina, substância resultante da combinação do ácido octanóico com L-carnitina (composto adjuvante na terapia da deficiência de MCAD), também inibiu a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Esses resultados indicam que possivelmente o efeito terapêutico da L-carnitina administrada aos pacientes durante as crises deve-se ao fato de a substância formada, octanoilcarnitina, ter excreção renal mais rápida do que o ácido octanóico e não que seja um composto sem toxicidade. Tais resultados sugerem fortemente um papel chave do ácido cis-4-decenóico como a substância mais tóxica, dentre os metabólitos testados, para a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, uma vez que seu efeito é marcado, mesmo em concentrações relativamente baixas (0.25 mM), encontradas nos pacientes com deficiência de MCAD durante as crises (Onkenhout, 1995).

Investigamos então os mecanismos responsáveis pelo efeito inibitório do ácido cis-4-decenóico sobre a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. Testamos a influência da co-incubação do ácido cis-4-decenóico com uma combinação das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase (CAT+SOD) (a SOD catalisa a reação de dois radicais superóxido, formando peróxido de hidrogênio que é degradado pela CAT) (Halliwell, 2001), L-NAME (antagonista da enzima óxido nítrico sintase) e GSH (antioxidante endógeno mais comum no cérebro) (Halliwell, 2001). Verificamos que o GSH e o L-NAME atenuaram, enquanto que CAT+SOD

aboliram completamente o efeito inibitório do ácido cis-4-decenóico sobre a enzima, sugerindo que este composto deve afetar o funcionamento da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase através da oxidação de grupos essenciais da enzima indiretamente, via radicais livres, especialmente através dos radicais peróxido. Esses resultados foram semelhantes aqueles obtidos com o ácido octanóico que também pareceu inibir a enzima via oxidação de grupos essenciais da mesma.

Para confirmar a hipótese de que esses ácidos poderiam induzir estresse oxidativo na célula, foram testados os efeitos dos ácidos octanóico, decanóico e cis-4-decenóico sobre parâmetros de lipoperoxidação, tais como as medidas de formação de quimioluminescência (González-Flecha, Llesuy & Boveris, 1991) e de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) (Esterbauer & Cheeseman, 1990), em córtex cerebral de ratos. Esses parâmetros foram significativamente aumentados pela presença desses ácidos, indicando, portanto, que os ácidos octanóico, decanóico e cis-4-decenóico poderiam ter afetado a enzima Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase indiretamente, via peroxidação dos lipídios da membrana plasmática. Este tipo de relação entre lipoperoxidação de membranas celulares e inibição da atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase tem sido extensamente descrito (Marzatico et al., 1990; Lees, 1993; Kurella et al., 1997; Tsakiris et al., 2000; Yousef et al., 2002). Neste particular, deve ser enfatizado que o cérebro possui um alto conteúdo de lipídios e baixas concentrações de antioxidantes quando comparado a outros tecidos (Halliwell, 2001), o que torna este tecido mais vulnerável a efeitos nocivos de espécies reativas do oxigênio. De fato, o estresse oxidativo tem sido considerado como fator etiopatogênico do dano neurológico de um grande número de doenças neurodegenerativas (Matès, Pérez-Goméz & Nuñez de Castro, 1999;

Reznick & Pacher, 1993). Entretanto não podemos descartar a hipótese de que as inibições da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase causadas pelos ácidos graxos acima descritos podem também ter ocorrido devido a outros fatores, tais como mudanças de fluidez, de permeabilidade iônica e de interações entre os fosfolípidios da membrana plasmática com a enzima (Kimmelberg & Pahadjopoulos, 1974; Lee, 1976; Abeywardena, Allen & Chernock, 1983; Carfagna & Muhoberac, 1983).

Por outro lado, há fortes evidências mostrando que a diminuição na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase está envolvida em mecanismos de neurotoxicidade (Sweadner, 1979; Lees, 1993), podendo levar a apoptose e/ou necrose (Xiao et al., 2000; Wang et al., 2003), visto que esta enzima é crucial para manter os gradientes iônicos necessários para a realização das sinapses e também para o desenvolvimento e funcionamento normais do sistema nervoso central. Assim, diminuições na atividade desta importante enzima têm sido relatadas em casos de encefalopatia espongiiforme e *status convulsivus* (Renkawek et al., 1992), de excitotoxicidade e epilepsia (Grisar, 1984; Bem-Ari, 1985; Choi & Rothman, 1990; Cousin et al., 1995; Lees & Leong, 1995), em doenças neurodegenerativas crônicas como Alzheimer (Lees, 1991), bem como em glioma do sistema nervoso central, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico, panencefalite esclerosante subaguda, epilepsia generalizada primária, doença de Parkinson, síndrome de Down e outras desordens neurodegenerativas (Kumar & Kurup, 2002). Por isso acreditamos que, se nossos resultados *in vitro* envolvendo a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase puderem ser extrapolados *in vivo* para a deficiência de MCAD, os mesmos poderiam explicar, ao menos em parte, alguns dos

sintomas neurológicos apresentados pelos pacientes com deficiência de MCAD durante as crises.

Também testamos a influência dos ácidos octanóico, decanóico e cis-4-decenóico sobre a produção de CO<sub>2</sub> a partir de [1-<sup>14</sup>C]-acetato, [U-<sup>14</sup>C]-glicose e [1,5-<sup>14</sup>C] citrato, com o intuito de avaliar a atividade do ciclo do ácido cítrico em córtex cerebral de ratos jovens. Os resultados mostraram que os ácidos octanóico e decanóico tiveram um efeito inibitório mais pronunciado sobre a produção de CO<sub>2</sub> a partir de glicose (em torno de 70%) do que a partir de acetato (em torno de 40%). Já o ácido cis-4-decenóico inibiu a produção de CO<sub>2</sub> a partir de ambos substratos com igual intensidade (em torno de 40%). Tendo em vista que a produção de CO<sub>2</sub> a partir de acetato depende, além das enzimas do ciclo de Krebs, bem como da atividade da acetil-CoA sintase, testamos também a produção de CO<sub>2</sub> a partir de citrato, que não depende desta enzima. Verificamos que os ácidos decanóico e cis-4-decenóico inibiram a produção de CO<sub>2</sub> a partir de citrato (em torno de 40%), o que indica um efeito inibitório desses ácidos sobre uma ou mais reações do ciclo do ácido cítrico ou então um efeito inibitório sobre a atividade da cadeia respiratória, com inibição secundária do ciclo de Krebs. Por outro lado, o ácido octanóico não inibiu a produção de CO<sub>2</sub> a partir de citrato. Os resultados sugerem que o ácido octanóico poderia afetar a atividade da enzima citrato sintase e/ou da acetil-CoA sintase, visto que o metabólito inibe a produção de CO<sub>2</sub> a partir de acetato. Por isso, foi testada também a influência do ácido octanóico sobre a atividade da citrato sintase, mas nenhum efeito sobre a atividade dessa enzima foi detectado. Portanto, é possível a ocorrência de um efeito inibitório do ácido octanóico sobre a atividade da acetil-CoA sintase, mas



que, no entanto, não foi testado no presente trabalho. Além disso, tendo em vista que a produção de CO<sub>2</sub> a partir de glicose não depende somente das enzimas do ciclo de Krebs, mas também das enzimas da via glicolítica, não se pode afastar a hipótese de que os ácidos octanóico e decanóico poderiam também interferir no funcionamento de uma ou mais enzimas da glicólise, justificando assim o efeito inibitório bem maior observado na produção de CO<sub>2</sub> a partir de glicose, quando comparado ao efeito inibitório quando se utiliza acetato como substrato. Neste sentido, há alguns trabalhos demonstrando que ácidos graxos de cadeia longa e média inibem no fígado as atividades das enzimas hexoquinase, fosfofrutoquinase e piruvato desidrogenase (Lea & Weber, 1968; Scholz, Schwabe & Soboll, 1984).

Testamos então os efeitos dos ácidos decanóico e cis-4-decenóico sobre as atividades dos complexos da cadeia respiratória e da enzima creatinaquinase. Os ácidos decanóico e cis-4-decenóico diminuíram significativamente as atividades de alguns complexos da cadeia respiratória. O ácido decanóico inibiu as atividades dos complexos II-III e IV na concentração de 3 mM, enquanto que o ácido cis-4-decenóico inibiu as atividades dos complexos II e II-III a partir da concentração de 0,25 mM e do complexo IV a partir da concentração de 0,1 mM. Em relação a estes resultados é importante destacar que o ácido cis-4-decenóico inibiu a cadeia respiratória em concentrações baixas semelhantes às encontradas na deficiência de MCAD. Quanto ao significado fisiológico desses dados, enfatizamos que inibições de mesma intensidade da cadeia respiratória têm sido relatadas em várias doenças neurológicas degenerativas, como a doença de Alzheimer, a esclerose lateral amiotrófica e a síndrome de Leigh (Cassarino & Bennett, 1999; Di Donato, 2000; Harpey et al., 1998; Lee et al., 1996; Morin et al., 1999; Salo et al.,

1992; Tulinius et al., 1991a; Tulinius et al., 1991b, Willis et al., 2000; Wörle et al., 1998; Zerviani). Portanto, o grau de inibição dessas atividades encontradas no presente trabalho pelos metabólitos acumulados na deficiência de MCAD poderia explicar ao menos em parte a disfunção neurológica que acomete esses pacientes.

Levando-se em conta que a cadeia respiratória mitocondrial é uma poderosa fonte de radicais livres, através dos complexos I e III (Genova et al., 2001; Lenaz et al., 2002; Raha & Robinson, 2001; Chen et al., 2003), consideramos a hipótese de que o bloqueio dos complexos da cadeia respiratória pelos ácidos decanóico e cis-4-decenóico poderia resultar no aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, que por sua vez seriam capazes de causar dano oxidativo em enzimas susceptíveis à oxidação por radicais livres, como por exemplo, a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e a creatinaquinase. Além disso, é possível que um bloqueio na cadeia respiratória de grau semelhante ao encontrado neste trabalho pode resultar em bloqueio em várias etapas do ciclo de Krebs (pelo acúmulo de NADH que é inibidor alostérico de várias enzimas dessa rota), bem como da produção de ATP celular (Rustin & Rötig, 2002). O bloqueio da cadeia respiratória e do ciclo de Krebs reflete um bloqueio do metabolismo aeróbico, e, por conseguinte uma ativação do metabolismo anaeróbico. Assim, é possível que nossos achados poderiam estar relacionados com os altos níveis de lactato no sangue e líquido, bem como com anormalidades na musculatura esquelética (rabdomiólise) encontrados em alguns pacientes com deficiência de MCAD (Feillet et al., 2003; Ruintenbeek, 1995).

Nossos resultados *in vitro* estão em consonância com os achados *in vivo* recentemente descritos em pacientes com desordens de oxidação de ácidos graxos, como, por exemplo, na deficiência da desidrogenase 3-hidroxiacil-CoA de cadeia longa (LCHAD), que apresentam defeitos (inibições) secundários em complexos da cadeia respiratória, sugerindo o envolvimento de intermediários tóxicos da oxidação de ácidos graxos nos defeitos funcionais e alterações morfológicas encontradas nas mitocôndrias destes pacientes (Antozzi et al., 1994; Das et al., 2000; Enns et al., 2000; Tyni et al., 1996; Ventura et al., 1995; Ventura et al., 1996; Ventura et al., 1998).

Já em relação à creatinaquinase, o ácido cis-4-decenóico foi o único ácido graxo testado que diminuiu significativamente a atividade desta enzima, especialmente a fração mitocondrial, mas apenas na concentração mais elevada (1 mM). Com o intuito de verificar se essa ação inibitória fosse devida à indução de estresse oxidativo, foram adicionados ao meio de incubação simultaneamente com o ácido cis-4-decenóico os agentes antioxidantes vitaminas C+E, GSH ou L-NAME. Nenhum dos antioxidantes preveniu a inibição causada pelo ácido cis-4-decenóico sobre a creatinaquinase, sugerindo que o seu efeito não está relacionado com a oxidação de grupamentos tiólicos da creatinaquinase, ou com a formação de radicais livres. De qualquer forma, acreditamos que dificilmente este efeito poderia ser relevante no que se refere à deficiência de MCAD, visto que o ácido cis-4-decenóico alterou a atividade desta enzima somente na concentração mais alta (1mM), acima da encontrada em pacientes afetados por essa doença mesmo durante as crises.

Por outro lado, levando-se em consideração as concentrações dos metabólitos acumulados na deficiência de MCAD (ácido octanóico 0,6 mM; ácido decanóico 0,2 mM e ácido cis-4-decenóico 0,5 mM) (Onkenhout et al., 1995), podemos concluir que os resultados mais relevantes do ponto de vista fisiológico da presente investigação são aqueles devidos à inibição do ácido cis-4-decenóico sobre a enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, que foi de aproximadamente 40% já na concentração de 0.25 mM, bem como a inibição causada por esta mesma substância sobre os complexos da cadeia respiratória. Os complexos II e II-III foram significativamente inibidos pelo ácido cis-4-decenóico a partir de 0.25 mM e o complexo IV a partir de 0.1 mM. Além disso, a produção de  $\text{CO}_2$  a partir de glicose foi inibida pelos ácidos octanóico, decanóico e cis-4-decenóico a partir de 0,5 mM, 0,5 mM e 0,1 mM respectivamente, e a produção de  $\text{CO}_2$  a partir de acetato foi inibida em torno de 40% pelo ácido cis-4-decenóico na concentração de 0.5 mM. Portanto, o ácido cis-4-decenóico, o composto patognomônico da deficiência de MCAD, foi, em nossas condições experimentais *in vitro*, o composto mais tóxico para metabolismo energético cerebral. Entretanto não podemos descartar a possibilidade de ocorrerem efeitos somatórios e até mesmo sinérgicos na doença, onde os três ácidos graxos encontram-se simultaneamente aumentados.

Convém salientar que é provável que os pacientes afetados por deficiência de MCAD apresentem durante as crises de descompensação metabólica elevados níveis de ácidos graxos não somente na circulação periférica, mas também no sistema nervoso central devido à existência na barreira hematoencefálica de um carreador monocarboxílico específico para ácidos graxos com cadeia de até 10

carbonos (Oldendorf, 1973). Outro importante fator para o acúmulo de ácidos graxos de cadeia média no sistema nervoso central é que o plexo coróide, estrutura especializada na depuração de compostos do cérebro para o líquido cerebroespinal, tem sua função prejudicada pelos ácidos decanóico e octanóico (Kim et al., 1983). Também foi demonstrado que a barreira hematoencefálica torna-se menos seletiva à entrada de compostos no cérebro na presença do ácido octanóico, facilitando a penetração de ácidos graxos no sistema nervoso central (McClung et al., 1990). Além disso, considerando-se que os intermediários acumulados em erros inatos do metabolismo formem-se intracelularmente, foi proposto que suas concentrações intracelulares sejam muito maiores do que as encontradas na circulação ou no líquido cefalorraquidiano (Hoffmann et al., 1993). Assim, considerando que as enzimas de catabolismo de ácidos graxos estão expressas no cérebro poder-se-ia presumir que os ácidos graxos de cadeia média estejam acumulados no cérebro de pacientes com deficiência de MCAD.

Acreditamos que nosso trabalho possa contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos responsáveis pelo dano cerebral e sintomas neurológicos observados nos pacientes com deficiência de MCAD. Não temos conhecimento de nenhum outro trabalho direcionado especificamente para determinar se os metabólitos acumulados na deficiência de MCAD podem alterar parâmetros do metabolismo energético cerebral como os determinados na presente investigação, tais como as atividades da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, dos complexos da cadeia respiratória, da creatinaquinase e a produção de  $\text{CO}_2$ . Caso nossos resultados pudessem ser extrapolados para os portadores de deficiência de MCAD, os mesmos indicam que nessa doença os sintomas neurológicos podem

ser devido à toxicidade dos metabólitos acumulados nos pacientes, prejudicando o metabolismo energético e não somente a um déficit de glicose cerebral secundário à hipoglicemia e/ou ao acúmulo de amônia (Stanley et al., 1983).

Nossos resultados poderiam também colaborar, no futuro, para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento dos sintomas neurológicos apresentados pelos pacientes, especialmente durante as crises. Postula-se que o tratamento poderia ser baseado em métodos para evitar o aumento das concentrações dos metabólitos potencialmente tóxicos nos pacientes, especialmente do ácido cis-4-decenóico, que é derivado da oxidação parcial do ácido linoleico (Duran et al., 1988), seguido pelos ácidos decanóico e octanóico, bem como na administração de antioxidantes aos portadores da doença.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

**1)** Os ácidos octanóico e decanóico inibiram significativamente a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase *in vitro* em homogeneizado de córtex cerebral de ratos na concentração de 3 mM, enquanto o ácido oléico inibiu essa mesma atividade a partir da concentração de 0,01 mM.

**2)** A inibição causada pelo ácido octanóico sobre a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase em homogeneizado de córtex cerebral de ratos foi totalmente prevenida pela adição de glutathione (1mM) e pela adição de trolox (1 mM).

**3)** Os ácidos octanóico (1 e 3 mM) e decanóico (3 mM) inibiram a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase *in vitro* em membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos, enquanto o ácido cis-4-decenóico inibiu essa atividade a partir de 0,25 mM.

**4)** O efeito inibitório causado pelo ácido cis-4-decenóico sobre a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase foi abolido parcialmente pelo inibidor da óxido nítrico sintase L-NAME e pelo antioxidante GSH e totalmente pela combinação das enzimas catalase e superóxido dismutase.

**5)** A octanoilcarnitina inibiu a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase *in vitro* em membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos na concentração de 1 mM, enquanto hexanoilcarnitina, hexanoilglicina, suberilglicina e 3-fenilpropionilglicina não alteraram a atividade da enzima nessa mesma concentração.

**6)** O ácido cis-4-decenóico inibiu a atividade dos complexos II e II-III a partir de 0,25 mM, e IV a partir de 0,1 mM.

**7)** O ácido octanóico (3 mM) não alterou as atividades dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória *in vitro* em homogeneizados de córtex cerebral de ratos, enquanto o ácido decanóico inibiu os complexos II-III e IV, mas somente em uma concentração bastante elevada (3 mM) e o ácido cis-4-decenóico inibiu a atividade dos complexos II, II-III (a partir de 0,25 mM) e IV(a partir de 0.1 mM).

**8)** Os ácidos octanóico, decanóico e cis-4-decenóico inibiram a produção de  $\text{CO}_2$  a partir de glicose *in vitro* em homogeneizados de córtex cerebral de ratos (a partir de 0,5 e 0,1 mM respectivamente).

**9)** Os ácidos octanóico e decanóico inibiram a produção de  $\text{CO}_2$  a partir de acetato *in vitro* em homogeneizados de córtex cerebral de ratos a partir de 1 mM, entretanto o ácido cis-4-decenóico inibiu esse parâmetro a partir de 0,5 mM.

**10)** O ácido octanóico (3 mM) não alterou a produção de  $\text{CO}_2$  a partir de citrato *in vitro* em homogeneizados de córtex cerebral de ratos, enquanto os ácidos



decanóico e cis-4-decenóico inibiram esse parâmetro a partir de 3 mM e 1 mM, respectivamente.

**11)** Os ácidos octanóico, decanóico e cis-4-decenóico não alteraram a atividade da citrato sintase *in vitro* em homogeneizados de córtex cerebral de ratos.

**12)** Os ácidos octanóico e decanóico (3 mM) não alteraram a atividade da creatinaquinase *in vitro* nas frações mitocondrial e citosólica, e em homogeneizado total de córtex cerebral de ratos, enquanto o ácido cis-4-decenóico inibiu essa atividade em todas essas frações na concentração de 1 mM.

**13)** O efeito inibitório do ácido cis-4-decenóico (1 mM) sobre a atividade da creatinaquinase *in vitro* não foi abolido pela coincubação do ácido com antioxidantes em homogeneizado total de córtex cerebral de ratos.

**14)** Os ácidos octanóico e decanóico aumentaram a produção de quimioluminescência *in vitro* em homogeneizados de córtex cerebral de ratos na concentração de 1 mM, enquanto o ácido cis-4-decenóico aumentou essa medida a partir de 0,25 mM.

**15)** Os ácidos octanóico e decanóico aumentaram a produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) *in vitro* em homogeneizados de córtex cerebral de ratos na concentração de 1 mM, enquanto o ácido cis-4-decenóico alterou esse parâmetro na concentração de 0,25 mM.

## 6. PERSPECTIVAS

1) Verificar os efeitos dos ácidos octanóico, decanóico e cis-4-decenóico sobre a viabilidade celular em neurônios cultivados de embriões de ratos, utilizando as medidas de redução do MTT e do Alamar Blue, bem como sobre parâmetros indicativos de necrose (medida da lactato desidrogenase e análise da morfologia celular) e apoptose (ativação das caspases 3, 8 e 9 e contagem dos núcleos fragmentados). Caso sejam detectados efeitos desses ácidos graxos sobre a viabilidade celular (necrose e/ou apoptose), poderíamos também:

A) Investigar os possíveis mecanismos envolvidos na alteração da viabilidade celular (necrose e/ou apoptose) provocada por esses metabólitos, através do uso de antioxidantes, substratos energéticos e antagonistas glutamatérgicos nas culturas de neurônios de embriões de ratos.

B) Investigar os efeitos dos ácidos octanóico, decanóico e cis-4-decenóico sobre o influxo de cálcio intracelular nas culturas de neurônios de embriões de ratos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeywardena M.Y., Allen, T.M., Charnock J.S., Lipid-protein interactions of reconstituted membrane-associated adenosine triphosphatases. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.729, p.62-74, 1983.
- Aksenov M., Aksenova M., Butterfield A., Markesbery, W. R., Oxidative modification of Creatine Kinase BB in Alzheimer's Disease Brain. *J. Neurochem.*, v.74, n.6, p. 2520-2526, 2000.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. (eds.). *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artes Medicas, 3<sup>a</sup> edição, 1997.
- Alexander J.J., Snyder, A., Tonsgard J.H., Omega-oxidation of Monocarboxilic Acids in Rat Brain. *Neurochem. Res.*, v.23, n.2, p.227-233, 1998.
- Amruthesh S.C., Falckj. R., Ellis E.F., Brain Synthesis and Cerebrovascular Action of Epoxygenase Metabolites of Arachidonic Acid. *J. Neurochem.*, v.58, n.2, p.503-509, 1992.
- Antozzi C., Garavaglia B., Mora M., Rimoldi M., Morandi L., Ursino E., Didonato S., Late-onset riboflavin-responsive myopathy with combined multiple acyl cenzyme A dehydrogenase and respiratory chain deficiency. *Neurology.*, v.44, p.2153-2158, 1994.

- Arens R., Gozal D. Jain K., Muscati S., Heuser E.T., Williams J.C., Keens T.G., Ward S.C., Prevalence of medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency in the sudden infant death syndrome. *J. Pediatr.*, v.122, n.5, p.715-718, 1993.
- Bauché F., Sabourault D., Giudicelli Y., Nordmann J., Nordmann R., 2-Mercaptoacetate administration depresses the  $\beta$ -oxidation pathway through an inhibition of long-chain acyl-CoA dehydrogenase activity. *Biochem. J.*, v.196, p.803-809, 1981.
- Ben-Ari Y., Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, v.14, p.375-403, 1985.
- Bennett M.J., Powell S., Metabolic disease and sudden, unexpected death in infancy. *Hum. Pathol.*, v.25, n.8, p.742-746, 1994.
- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. Bioquímica. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 5ª edição, 2004.
- Berry M. N., Clarck D. G., Grivell A. R., Wallace P. G., The Calorigenic Nature of Hepatic Ketogenesis: An Explanation for the Stimulation of Respiration Induced by Fatty Acid Substrates. *Eur. J. Biochem.* v.131, p.205-214, 1983.
- Burton G.W., Wronska U., Stone L., Foster D.O., Ingold K.U, Biokinetics of dietary RRR- $\alpha$ -tocopherol in the male guinea-pig at three dietary levels of vitamin C and two levels of vitamin E. *Lipids* 25: 199-210, 1990.
- Carfagna M.A., Muhoberac B.B., Interactions of tricyclic drug analogs with synaptic plasma membranes: structure-mechanism relationships in inhibition of

- neuronal Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity. *Mol. Pharmacol.* v.44, p.129-141, 1993.
- Cassarino D.S., Bennett J.R., 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. Rev.*, v.29, p.1-25, 1999.
- Chace D.H., Hillman S.L., Van Hove J.L.K., Naylor E.W., Rapid Diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* v.43, n.11, p. 2106-2113, 1997.
- Chen Q., Vazquez E.J., Moghaddas S., Hoppel C.L., Lesnefsky EJ Production of reactive oxygen species by mitochondria. Central role of complex III. *J. Biol. Chem.* v.278, n.38, p.36027-36031, 2003.
- Choi D.W., Rothman S.M., The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev.* v.13, p.171-182, 1990.
- Costa C.G., Guérand W.S., Struys E. A., Holwerda U., ten Brink H.J., Tavares de Almeida I., Duran M., Jakobs C., Quantitative analysis of urinary acylglycines for the diagnosis of  $\beta$ -oxidation defects using GC-NCI-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* v.21, p. 1215-1224, 2000.
- Cousin M.A., Nicholls D.G., Pockoc J.M., Modulation of ion gradients and glutamate release in cultured cerebellar granule cells by ouabain. *J. Neurochem.* v.64, p.2097-2104, 1995.
- Darras B.T., Friedman N.R., Metabolic Myopathies: A Clinical Approach; Part II. *Pediatr. Neurol.* v.22, p.171-181, 2000.

- Das A.M., Fingerhut R., Wanders R.J.A., Ullrich K., Secondary respiratory chain defect in a boy with long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: possible diagnostic pitfalls. *Eur. J. Pediatr.*, v.159, p.243-246, 2000.
- Davis F.B., Davis P.J., Blas S.D., Schoenl M., Action of long-chain fatty acids *in vitro* on  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulatable,  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase activity in human red cell membranes. *Biochem. J.* v.248, p.511-516, 1987.
- Del Prete E., Lutz T. A., Althaus J., Scharrer E., Inhibitors of Fatty Acid Oxidation (Mercaptoacetate, R-3-Amino-4-Trimethylaminobutiric Acid) Stimulate Feeding in Mice. *Physiol. Behav.* v.63, n.5, p.751-754, 1998.
- Di Donato S., Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *J. inherit. Metabol. Dis.*, v.23, p.247-263, 2000.
- Donaldson J., St-Pierre J., Minich J., Barbeal A., Seizures in rats associated with divalent cation inhibition of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. *Can. J. Biochem.* v.49, p.1217-1224, 1977.
- Downing M., Rose P., Bennett M.J., Manning M.J., Pollitt R.J., Generalised Dicarboxylic Aciduria: A Common Finding in Neonates. *J. Inherit. Metab. Dis.* v.12 n.2, p. 321-324, 1989.
- Duran M., Bruinvis L., Ketting D., de Klerk J.B., Wadman S.K., Cis-4-decenoic acid in plasma: a characteristic metabolite in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Clin. Chem.* v.34, n.3, p.548-551, 1988.

- Ellis E.F., Police R.J., Yancey M., McKinney J.S., Amruthesh S.C., Dilution of cerebral arterioles by cytochrome P-450 metabolites of arachidonic acid. *Am. J. Physiol.* v.259, p. H1171-H1177, 1990.
- Enns G. M., Bennett M. J., Hoppel C. L., Goodman S.I., Weisiger K., Ohnstad C., Golabi M., Packman S., Mitochondrial respiratory chain complex I deficiency with clinical and biochemical features of long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *J. Pediatr.* v.136, p.251-254, 2000.
- Erecnska M., Silver I.A., Ions and energy in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* v.43, p.37-71, 1994.
- Estebauer H., Cheeseman K.H., Determination of aldehydic lipid peroxydation products; malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth. Enzymol.*, v.186, p.407-421, 1990.
- Feillet F., Steimann G.G., Vianey-Saban C., de Challou C., sadoul N., Lefebvre E., Vidailhet M., Bollaert P.E., Adult presentation of MCAD deficiency revealed by coma and severe arrhythmias. *Intensive Care Med.*, v.29, p.1594-1597, 2003.
- Freund K., Mizzer J., Dick, W., Thorpe C., Inactivation of General Acyl-CoA Dehydrogenase from Pig Kidney by 2-Alkynoyl Coenzyme A Derivatives: Initial Aspects. *Biochemistry* v.24, p.5996-6002, 1985.
- Geering, K., Subunit assembly and functional maturation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. *J. Membrane Biol.* v.155, p.109-121, 1990.
- Genova M.S., Ventura B., Giuliano G., Bovina C., Formiggini G., Castelli G. P., Lenaz G., The site of production of superoxide radical in mitochondrial complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Letters* v.505, p.364-8, 2001.

- González-Flecha B., Llesuy S., Boveris A., Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic. Biol. Med.*, v.10, p.93-100, 1991.
- Grisar T., Glial and neuronal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump in epilepsy. *Ann. Neurol.* v.16, p.S128-S134, 1984.
- Haliwell B., Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*, v.18, n.9, p.685-716, 2001.
- Hanglund M.M., Sthal W. L., Kunkel D.D., Schwartzkroin P.A., Developmental and regional differences in the localization of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in the rabbit hippocampus. *Brain Res.* v.343, p.198-203, 1985.
- Harpey J.P., Heron D., Prudent M., Charpentier P., Rustin G., Ponsot B., Cormier Daire V., Diffuse leukodystrophy in an infant with cytochrome-c oxidase deficiency. *J. inher. Metab. Dis.*, v. 21, p.748-752, 1998.
- Hitschke K., Bühler R., Apell H.J., Stark G., Inactivation of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase by radiation-induced free radical-chain mechanism. *FEBS Lett.* v.353, p.297-300, 1994.
- Hoffmann G.F., Meier-Augustein W., Stockler S., Surtess R., Rartig D., Nyhan W.L., Physiology and pathology of organic acids in cerebral spinal fluid. *J. inherit. Metab. Dis.*, v.16, p.648-669, 1993.
- Holton J.B., Allen J.T., Green C.A, Partington S., Gilbert R.E., Berry P.J., Inherited metabolic diseases in the sudden infant death syndrome. *Arch. Dis. Child.* v.66, p.1315-1317, 1991.



- Jacobson I.R., Hagberg H., Sanberg M., Hamberger A., Ouabain-induced changes in extracellular aspartate, glutamate and GABA levels in the rabbit olfactory bulb *in vivo*. *Neurosci. Lett.* V.64, p.211-215, 1986.
- Kaldis P., Hemmer W., Zanolla E., Holtzman D., Walliman T., "Hot Spots" of Creatine Kinase Localization in Brain: Cerebellum, Hippocampus and Choroid Plexus. *Dev. Neurosci.* v.18, p.542-554, 1996.
- Kim C.S., O'tuama L.A., Mann J.D., Roe C.R., Effect of increasing carbon chain length on organic acid transport by the choroid plexus: a potential factor in Reye's syndrome. *Brain Res.* v.259, p.340-343, 1983.
- Kim C.S., Dorgan D.R., Roe C.R. L-Carnitine: therapeutic strategy for metabolic encephalopathy. *Brain Res.* v.310, p.149-153, 1984.
- Kim C.S., Roe C.R., Ambrose W.W., L-Carnitine prevents mitochondrial damage induced by octanoic acid in the rat choroid plexus. *Brain Res.* v.536, p.335-338, 1990.
- Kimmelberg H., Pahadjopoulos D., Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transitions, and cholesterol on (Na<sup>+</sup> +K)-stimulated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, v.249, p.1071-1080, 1974.
- Kumar A.R., Kurup P.A., Inhibition of membrane Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity: a common pathway in central nervous system disorders. *J. Assoc Physicians India* v.50, p.400-6, 2002.
- Kurella E., Kukley M., Tyulina O. Dobrota D., Matejovilova M., Mezesova V., Boldyrev A., Kinetic parameters of Na/K-ATPase modified by free radicals *in vitro* and *in vivo*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.834, p.661-665, 1997.

- Lea M.A., Weber G., Role of enzymes in homeostasis: VIII. Inhibition of the activity of glycolytic enzymes by free fatty acids. *J. Biol. Chem.*, v.243, p.1096-1102, 1968.
- Lee A.G., A Model for action of local anesthetics. *Nature (Lond.)* v.262, p.545-548, 1976.
- Lee P.J., Harrison E.L., Jones M.G., Jones S., Leonard J.V., Chalmers R.A., L-carnitine and exercise tolerance in medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (MCAD) deficiency: a pilot study. *J. Inherit. Metab. Dis.* v.28, n.2, p.141-152, 2005.
- Lee W.T., Wang P.J., Young C., Wang T.R., Shen Y.Z., Cytochrome c oxidase deficiency in fibroblasts of a patient with mitochondrial encephalopathy. *J. Formos. Med. Assoc.* v.95, p.709-711, 1996.
- Lees G.J., Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. *Brain Res Brain Res Rev*, v.16, p.283-300, 1991.
- Lees G. J., Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience* v.54, p.287-322, 1993.
- Lees G.J., Leong W. Brain lesions induced by specific and non-specific inhibitors of sodium potassium ATPase. *Neurosci. Lett.* v.188, p.113-116, 1995.
- Lenaz G., Bovina C., D'aurelio M., Fato R., Formiggini G., Genova M.L., Giuliano G., Pich M.M., Paolucci U., Castelli G.P., Ventura B., Role of mitochondria in

- oxidative stress and aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* v.959, p.199-213, 2002.
- Lingrel J.B., Kuntzweiler T., Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biochem. Chem.* v.269, n.31, p.196599-196662, 1994.
- Manos P., Bryan G.K., Edmond J., Creatine Kinase Activity in Postnatal Rat Brain Development and in Cultured Neurons, Astrocytes, and Oligodendrocytes. *J. Neurochem.* v.56, n.6, p.2101-2107, 1991.
- Marks D.B., Marks A.D., Smith C.M.: Basic medical biochemistry. A clinical approach. Baltimore: Library of Congress, 1996.
- Martínez G., Jimenez-Sánchez G., Divry P., Vianey-Saban C., Rodes M., Briones P., Ribes A., Plasma free fatty acids in mitochondrial fatty acid oxidation defects. *Clin. Chim. Acta* v.267, p.143-154, 1997.
- Marzatico F., Gaetani P., Buratti E., Messina A.L., Ferlenga P., Rodriguez y Baena R., Effects of high-dose methylprednisolone on Na(+)-K+ATPase and lipid peroxidation after experimental subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurol. Scand.*, v.82, n.4, p.263-270.
- Matés J.M., Pérez-Gómez C., Núñez de Castro L., Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* v.8, p.585-603, 1999.
- Matsubara Y., Narisawa K., Tada K., Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: molecular aspects. *Eur. J. Pediatr.* v.151, p.154-159, 1992.
- McCandless D., Octanoic Acid-Induced Coma and Reticular Formation Energy Metabolism. *Brain Res.* v.335, p.131-137, 1985.
- McClung H.J., Sloan H. R., Powers P., Merola A.J., Murray R., Kerzner B., Pollack J.D., Early Changes in the Permeability of the Blood-Brain Barrier Produced

by Toxins Associated with Liver Failure. *Pediat. Res.* v.28, n.3, p.227-231, 1990.

Meister A., Anderson M.E., Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* v.52, p.711-760,

Molloy G.R., Wilson C.D., Benfield P., de Vellis J., Kumar S., Rat Brain Creatine Kinase Messenger RNA Levels Are High in Primary Cultures of Brain Astrocytes and Oligodendrocytes and Low in Neurons. *J. Neurochem.* v.59, n.5, p.1925-1931, 1992.

Morin C., Dub J., Robinson B.H., Lacroix J., Michaud J., de Braekeleer M., Geoffroy G., Lortie A., Blanchette C., Lambert M.A., Mitchell G.A., Stroke-like episodes in autosomal recessive cytochrome oxidase deficiency. *Ann Neurol.* v.45, p.389-392, 1999.

Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger principles of biochemistry.* New York: W. H. Freeman and company, Fourth ed., 2005.

Nicholls D.G., Ferguson S.J., *Bioenergetics 3.* Boston: Academic Press, 2002

Oldendorf W.H., Carrier-mediated blood-brain barrier transport of short-chain monocarboxylic organic acids. *Am. J. Physiol.* v.224, n.6, p.1450-1453, 1973.

Olson J.E., Holtzman D., Sankar R., Lawson C., Rosenberg R., Octanoic Acid Inhibits Astrocyte Volume Control: Implications for Cerebral Edema in Reye's Syndrome. *J. Neurochem.* v.52, n.4, p.1197-1202, 1989.

Onkenhout W., Venizelos V., van der Poel P.F.H., van den Heuvel, Poorthuis B.J., Identification and Quantification of Unsaturated Fatty Acid Metabolism in Plasma of Patients with Fatty Acid Oxidation Disorders. *Clin. Chem.* v.41, n.10, p.1467-1474, 1995.

Opdal S.H., Rognum, T.O., The sudden infant death syndrome gene: does it exist?

*Pediatrics* v.114, p.506-512, 2004.

Pande S.V., Mead J.F., Inhibition of Enzyme Activities by Free Fatty Acids. *J. Biol.*

*Chem.* v.243, n.23, p.6180-6185, 1968.

Pande S.V., Blanchaer M.C., Reversible Inhibition of Mitochondrial Adenosine Diphosphate Phosphorylation by Long Chain Acyl Coenzyme A Esters. *J. Biol.*

*Chem.* v.246, n.2, p.402-411, 1971.

Penzien J.M., Molz G., Wiensmann U.N., Colombo J.P., Buhlmann R., Wermuth B., Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency does not correlate with

apparent life-threatening events and the sudden infant death syndrome: results from phenylpropionate loading tests and DNA analysis. *Eur. J. Pediatr.* v.153, p.352-357, 1994.

Raha S., Robinson B.H., Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis.

*American Journal of Medical Genetics (Semin. Med. Genet.)* v.106, p.62-70, 2001.

Rapport R.L., Harris A.B., Friel P.N., Ojemann G.A., Human epileptic brain. Na<sup>+</sup>,

K<sup>+</sup>-ATPase activity and phenytoin concentration. *Arch. Neurol.* V.33, p.549-554, 1975.

Reichmann H., Maltese W.A., de Vivo D.C., Enzymes of Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation in

Developing Brain. *J. Neurochem.* v.51, n.2, p.339-344, 1988.

- Renkavek K., Renier W.O., De pont J.J., Vogels O.J., Gabreels F.J., Neonatal status convulsivus , spongiform encephalopathy, and low activity of (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase in the brain. *Epilepsy*, v.33, p.58-64, 1992.
- Reznick A.Z., Patcher L., Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In. Poli, G., Albano, E., Dianzani, M. U. (Eds.), Free Radicals: from Basic Science to Medicine, Birkhäuser Verlag, Basel pp. 425-437, 1993.
- Rinaldo P., O'shea J.J., Coates P.M., Hale D.E., Stanley C.A., Tanaka K., Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. Diagnosis by Stable-Isotope Dilution Measurement of Urinary n-Hexanoylglycine and 3-Phenylpropionylglycine. *N. Eng. J. Med.* v.319, n.20, p.1308-1313, 1988.
- Ruitenbeek W., Poels P.J.E., Turnbull D.M., Garavaglia B., Chalmers R.A., Taylor R.W., Gabreels F.J., Rhabdomyolysis and acute encephalopathy in late onset medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J. Neurol. Neuros. Psychiatr.* v.58, p.209-214, 1995.
- Rustin P., Rötig A., Inborn errors of complex II: unusual human mitochondrial diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1553, n.1-2, p.117-122, 2002.
- Salo M.K., Rapola J., Somer H., Pihko H., Koivileko M., trischler H., Oxidase deficiency. *Arch. Dis. Child.* v.67, p.1033-1035, 1992.
- Samson F., Dahl N., Dahl, D., A study on the narcotic action of the short chain fatty acids. *J. Biol. Chem.* v.5 July, 1956.

- Schmidt-Sommerfeld E., Penn D., Duran M., Kossak D., Li B.U., Huang Z.H., Gage D.A., Detection of inborn errors of fatty acid oxidation from acylcarnitine analysis of plasma and blood spots with the radioisotopic exchange-high-performance liquid chromatographic method. *J. Pediatr.* v.122, n.5, p.708-714, 1992.
- Scholz R., Schwabe U., Soboll S., Influence of fatty acids on energy metabolism. 1. Stimulation of oxygen consumption, ketogenesis and CO<sub>2</sub> production following addition of octanoate and oleate in perfused rat liver. *Eur. J. Biochem.* v.141, p.223-230, 1984.
- Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.L., Valle D., (eds.). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York: Mcgraw-Hill, 8<sup>th</sup> Edition, 2001.
- Silva C.G., Efeito “*In vitro*” de substâncias acumuladas na Citrulinemia e na Argininemia sobre a atividade da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos. Tese de mestrado pelo Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.
- Soboll S., Brdiczka D., Jahnke D., Schmidt A., Schlattner U., Wendt S., Wyss M., Wallimann T., Octamer-dimer Transitions of Mitochondrial Creatine Kinase in Heart Disease. *J. Mol Cell. Cardiol.* v.31, p.857-866, 1999.
- Stachowiak O., Dolder M., Wallimann T., Richter C., Mitochondrial Creatine Kinase Is a Prime Target of Peroxynitrite-induced Modification and Inactivation. *J. Biol. Chem.* v.273, n.27, p.16694-16699, 1998.
- Stanley C.A., Hale D.E., Coates P.M., Hall C.L., Corkey B.E., Yang W., Kelley R.I., Gonzales E.L., Williamson J.R., Baker L., Medium-chain acyl-CoA

- dehydrogenase deficiency in children with non-ketotic hypoglycemia and low carnitine levels. *Pediatr. Res.* v.17, p.877-884, 1983.
- Swarts H.G.P., Schuurmans Stekhoven F.M.A.H., de Pont, J.J.H.H.M., Binding of unsaturated fatty acids to Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase leading to inhibition and inactivation. *Biochim. Biophys. Acta* v.1024, p.32-40, 1990.
- Sweadner K.J., Two molecular forms of Na(+) K(+)-stimulated ATPase in brain. Separation, and difference in affinity for strophanthidin. *J. Biol. Chem.*v.254, p.6060-6067, 1979.
- Trauner D.A., Huttenlocher P.R., Short chain fatty acid-induced central hyperventilation in rabbits. *Neurology* v.28, p.940-944, 1978.
- Trauner D.A. Regional Cerebral Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Activity following Octanoate Administration. *Pediatr. Res.* v.14, p.844-845, 1980.
- Trauner D.A. Pathologic Changes in a Rabbit Model of Reye's Syndrome. *Pediatr. Res.* v.16, p.950-953, 1982.
- Tsakiris S., Angelogianni P., Schulpis K., Behrakis P., Protective effect of L-Cysteine and Glutathione on Rat Brain Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Inhibition Induced by Free Radicals. *Z. Naturforsch* v.55, p.271-277, 2000.
- Tserng K., Jin S., Hoppel C.L., Spiropentaneacetic Acid as a Specific Inhibitor of Medium-chain Acyl-CoA Dehydrogenase. *Biochemistry* v.30, p.10755-10760, 1991.
- Tulinius M.H., Holme E., Kristiansson B., Larsson N.G., Oldfors A., Mitochondrial encephalomyopathies in childhood: I. Biochemical and morphologic investigations. *J. Pediatr.*v.119, p.242-250, 1991a.



- Tulinius M.H., Holme E., Kristiansson B., Larsson N.G., Oldfors A., Mitochondrial encephalomyopathies in childhood:II.Clinical manifestations and syndromes *J. Pediatr.*v.119, p.251-259, 1991b.
- Tyni T., Majander A., Kalimo H., Rapola J., Pihko H., Pathology of skeletal muscle and impaired respiratory chain function in long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency with the G 1528 C mutation. *Neuromuscul. Dis.* v.6, p.327-337, 1996.
- Ventura, F.V., Ruiten J.P.N., Ijlst L., Tavares de Almeida I., Wanders R.J.A., Inhibition of oxidative phosphorylation by palmitoyl-CoA in digitonin permeabilized fibroblasts: implications for long-chain fatty acid  $\beta$ -oxidation disorders. *Biochem. Biophys. Acta.* v.1272, p.14-20, 1995.
- Ventura F.V., Ruiten J.P.N., Ijlst L., de Almeida I.T., Wanders R.J., Inhibitory effect of 3-hydroxyacyl-CoAs and other long-chain fatty acid  $\beta$ -oxidation intermediates on mitochondrial oxidative phosphorylation. *J. Inher. Metab. Dis.* v.19, p.161-164, 1996.
- Ventura F.V., Ruiten J.P.N., Ijlst L., de Almeida I.T., Wanders R.J., Lactic acidosis in long-chain fatty acid  $\beta$ -oxidation disorders. *J. Inher. Metab. Dis.* v.21, p.645-654, 1998.
- Voet D., Voet J.G., Biochemistry, 2nd Ed. New York, John Wiley Sons, Inc, 1995.
- Waddell L., Wiley V., Carpenter K., Bennetts B., Angel L., Andressen B.S., Wilken B., Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: genotype-biochemical phenotype correlations. *Mol. Genet. Metab.*v.87, n.1, p.32-39, 2006.

- Walker V., Inherited Organic Acids disorders. In Clayton, B.E. & Round, J.M. eds. Clinical Biochemistry and the Sick Child. 2<sup>nd</sup> edn. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p.130-141, 1994.
- Wang X.O., Xiao A.Y., Yang A., LaRose L., Wei L., Yu S.P., Block of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and induction of hybrid death by 4-aminopyridine in cultured cortical neurons. *J. Pharmacol. Ther.* V.305, n.2, p.502-506, 2003.
- Whittan R., The dependence of the respiration of brain cortex on active cation transport. *Biochem. J.* v.82, p.205-212, 1962.
- Willis T.A., Davidson J., George R., Gray F., Poulton K., Ramani P., Whitehouse W., Cytochrome oxidase deficiency presenting as birth asphyxia. *Dev. Med.Sci. Neurol.*, v.42, p.414-417, 2000.
- Wood J.M., Wallick E.T., Schwartz A., Chang C.H., The effect of palmitoyl-coenzyme A on rat heart and liver mitochondria. Oxygen consumption and palmitoylcarnitine formation. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.486, n.2, p.331-340, 1977.
- Wörle H., Köler B., Schlote W., Winkler P., Bastanier C.K., Progressive cerebral degeneration of childhood with liver disease (Alpers Hunttenlocher disease) with cytochrome oxidase deficiency presenting with epilepsy partialis continua as the first clinical manifestation. *Clin. Neuropathol.* v.17, p.63-68, 1998.
- Wyse A.T.S., Bolognesi G., Brusque A.M., Dutra-Filho, C.S., Wannmacher C.M.D., Wajner M., Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in the synaptic plasma membrane from the cerebral cortex of rats subjected to chemically induced phenylketonuria. *Med. Sci. Res.* v.23, p.261-262, 1995.

- Wyse A.T.S., Brusque A.M., Silva C.G., Streck E.L., Wajner M., Wannmacher C.M.D., Inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase from brain cortex by propionic acid. *Neuroreport* v.9, n.8, p.1719-1721, 1998.
- Xiao A.Y., Wei L., Xia S., Rothman S., Yu S.P., Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons. *J. Neurosci.*v.22, p.1350-1362.
- Yousef M.I., El-Hendy H.A., El-Demerdash F.M., Elagamy E.I., Dietary zinc deficiency induced-changes in the activity of enzymes and the levels of free radicals, lipids and protein electrophoretic behaviour in growing rats. *Toxicology.* v.175, 223-234, 2002.
- Zerviani M., Bertagnolio B., Uziel G., Neurological presentations of mitochondrial diseases. *J. Inherit. Metab. Dis.*, v.19, n.4, p.504-520, 1996.