

**EFEITOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DO ÁCIDO GLUTÁRICO SOBRE
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO METABOLISMO ENERGÉTICO EM
CÉREBRO MÉDIO, MÚSCULO ESQUELÉTICO E MÚSCULO
CARDÍACO DE RATOS JOVENS**

Gustavo da Costa Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Moacir Wajner

Co-orientadora: Prof. Dra. Carmen Regla Vargas

**Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas - Bioquímica da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em
Bioquímica.**

Porto Alegre, 2005.

AGRADECIMENTOS

À UFRGS pelo ensino gratuito e de muita qualidade.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica, especialmente aos do grupo de Erros Inatos do Metabolismo, pelos momentos de descontração.

Ao Denis Assis, o exótico, pela tranquilidade que transmite ao laboratório.

Ao Dr. César Ribeiro, o Chiquinho, pelas dicas *high-tech* e de atualidades.

Ao Rafael Borba Rosa, o Doutor nº 1, pela ajuda científica e pela amizade.

À Pati por toda a felicidade que deseja ao laboratório (que se vier metade já está ótimo), pela entusiasmo no dia-a-dia (inclusive nos fins de semana) e principalmente pela amizade.

Aos colegas de pós-graduação do laboratório de Erros Inatos do Metabolismo Guilhian, Karina Dalcin, Leticia e Vilson, pela excelente acolhida e pelo ambiente saudável no dia-a-dia.

Às bolsistas Anelise, Anna Laura, Cristiana, Juliana, Karina Scussiato, Rita e Vanessa, pela beleza que levam ao laboratório e pela dedicação.

À minha bolsista Carol, excelente bailarina, pelo seu empenho e amizade na construção deste trabalho.

Às minhas colegas do Laboratório de Análises de Metabólitos, por toda ajuda e companheirismo, principalmente à Dani, pelas horas dispensadas para a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas Douglas Fittarelli e Angela Sitta pelos momentos compartilhados.

A todo o pessoal do Serviço de Genética Médica, em especial a seu chefe, Roberto Giugliani.

À Prof. Ângela Wyse pelos “bons fluidos”.

Ao Prof. Clóvis pela paciência e inteligência no dia-a-dia.

Ao Prof. Dutra pela amizade e pelos inúmeros passes que me deixaram na cara do gol (mas eu erre!).

À Prof. Teresa Dalla-Costa pela ajuda com a farmacocinética.

Ao Prof. Perry pelas horas empregadas para conhecimentos de metabolismo e pelas empregadas com “outros” conhecimentos.

Ao Dr. Gabriel Civallero pelos conhecimentos cromatográficos (Hay que probar!) e por me incentivar aos estudos das “tenicas”.

À Dra. Alexandra Latini pela amizade, conhecimento e paciência, e pela humildade de aprender outros idiomas comigo.

A Prof. Carmen Vargas por toda atenção e paciência, e pelo apoio principalmente para a vida, além de sempre conseguir tempo para “dar uma conversada”.

A Moacir Wajner por todo o carinho e motivação e pela dedicação como orientador e amigo, preocupado com todos os detalhes para que os seus possam trabalhar de cabeça tranqüila.

À “família” Mary Close’s pelos momentos de “descontração” e amizade, em especial ao Batatá, ao Marcolino, ao Fabrício (amigão para qualquer momento, principalmente os de força e música, que agora ainda tem a Biba e o cabeludi) e ao Titi Knalha, maior sem-vergonha que realizou o sonho de entrar na família. Espero que retornemos em breve!

À Melissa, pelo que me ensinou sobre a vida e por todo o apoio nestes dois anos de mestrado.

À minha família Norma, Mélio, Raquel e Rafael, pela minha formação, pelo apoio e estímulo aos estudos, e principalmente pelo carinho a cada alvorada. Verdadeiros responsáveis pelas minhas conquistas.

A Deus.

“Nunca ande pelo caminho
traçado, pois ele conduz
somente até onde os outros
já foram.”

(Graham Bell)

RESUMO

O ácido glutárico (AG) é o principal metabólito acumulado nos tecidos e fluidos corporais de pacientes afetados por acidemia glutárica tipo I (AG I), um erro inato do metabolismo da via catabólica dos aminoácidos lisina, hidroxilisina e triptofano causado pela deficiência severa da atividade da enzima glutaril-CoA desidrogenase. Clinicamente, os pacientes apresentam macrocefalia ao nascimento e uma hipomielinização ou desmielinização progressiva do córtex cerebral. Crises de descompensação metabólica com encefalopatia aguda ocorrem nestes pacientes principalmente entre 3 e 36 meses de vida, levando a uma marcada degeneração estriatal, que é a principal manifestação neurológica da doença. Depois de sofrer essas crises, os pacientes apresentam distonia e discinesia que progridem rapidamente e os incapacita para as atividades normais. Apesar dos sintomas neurológicos severos e achados neuropatológicos com atrofia cerebral, os mecanismos que levam ao dano cerebral na AG I são pouco conhecidos.

O objetivo inicial do presente trabalho foi desenvolver um modelo animal por indução química de AG I através da injeção subcutânea do AG em ratos Wistar de forma que os níveis cerebrais deste composto atinjam concentrações similares aos encontrados em pacientes (~0,5 mM) para estudos neuroquímicos e comportamentais. Observamos que o AG atingiu concentrações no cérebro aproximadamente 10 vezes menores do que no plasma e 5 vezes menores do que nos músculos cardíaco e esquelético. O próximo passo foi investigar o efeito desse modelo sobre parâmetros do metabolismo energético no cérebro médio,

bem como nos tecidos periféricos (músculo cardíaco e músculo esquelético) de ratos de 21 dias de vida. Verificamos que a produção de CO₂ a partir de glicose não foi alterada no cérebro médio dos ratos, bem como a atividade da creatina quinase no cérebro médio, músculo cardíaco e músculo esquelético. A atividade do complexo I-III da cadeia respiratória estava inibida em cérebro médio de ratos (25%), enquanto no músculo esquelético estavam inibidas as atividades dos complexos I-III (25%) e II-III (15%) e no músculo cardíaco não foi encontrada nenhuma inibição dos complexos da cadeia respiratória. Em seguida, testamos o efeito *in vitro* do AG sobre os mesmos parâmetros do metabolismo energético e observamos uma inibição das atividades do complexo I-III (20%) e da succinato desidrogenase (30%) no cérebro médio na concentração de 5 mM do ácido. A produção de CO₂, a partir de glicose e acetato, e a atividade da creatina quinase não foram alteradas pelo AG no cérebro médio dos animais. Assim, concluímos que o AG interfere no metabolismo energético celular, o que poderia explicar, ao menos em parte, a fisiopatogenia da AG I.

ABSTRACT

Glutaric acid (GA) is the main tissue and body fluid accumulating metabolite in patients affected by glutaric acidaemia type I (GA I), an inborn error of lysine, hydroxylysine and tryptophan metabolism caused by the severe deficiency of the enzyme glutaryl-CoA dehydrogenase. Clinically, affected patients present macrocephaly and progressive hypomyelination or demyelination of cerebral cortex. Metabolic decompensation crises occur usually between 3 and 36 months of life, leading to marked striatal degeneration. After crises, patients present dystonia and dyskinesia that progress quickly to a movement disorder. Despite the severe neurological symptoms and neuropathological features, the mechanisms leading to cerebral damage are poorly known.

The initial aim of the present work was to develop a chemically animal model of GA I for investigating neurochemical and behavioral parameters through the subcutaneous injection of GA in order to reach GA cerebral levels similar to those found in affected patients (~0.5 mM). We observed that GA reached brain levels of about 10-fold lower than in plasma and 5-fold lower than in skeletal and cardiac muscles. The next step was to evaluate the effect of this model on energy metabolism parameters in midbrain, as well as in peripheral tissues (skeletal and cardiac muscles) in 21 old-day rats. We verified that CO₂ production from glucose was not altered in midbrain of rats, as well as creatine kinase activity in midbrain, skeletal and cardiac muscles. On the other hand, the complex I-III activity (25%) of the respiratory chain was inhibited in midbrain of rats, while in skeletal muscle the complex I-III (25%) and II-III (15%) activities were reduced and no alterations were

found in cardiac muscle. Finally, we tested the *in vitro* effect of GA on the same parameters and observed an inhibition of complex I-III (20%) and succinate dehydrogenase (30%) activities in midbrain at 5 mM GA concentration. It was observed that CO₂ production from glucose and acetate and creatine kinase activity were not modified by GA in rat midbrain. Therefore, we conclude from our results that GA interferes with cellular energy metabolism which could explain, at least in part, the pathophysiology of the neurological alterations found in GA I patients.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1. Via catabólica dos aminoácidos lisina, hidroxilisina e triptofano. 26
- Figura 1.2. Fluxo de elétrons através dos quatro complexos da cadeia respiratória. 46
- Figura 1.3. Reação catalisada pela creatina quinase (CK) 50
- Figura 1.4. Função do sistema Cr/CK/PCr na difusão dos grupamentos fosfato e no tamponamento dos níveis de ATP junto aos sítios de consumo. 52
- Figura 4.1. Efeito da administração do AG sobre a produção de CO₂ a partir de glicose em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens 84
- Figura 4.2. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. 86
- Figura 4.3. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. 87
- Figura 4.4. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. 88
- Figura 4.5. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de cérebro

- médio de ratos jovens. 89
- Figura 4.6. Efeito da administração do AG sobre a enzima succinato desidrogenase (SDH) em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. 90
 - Figura 4.7. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória em homogeneizados de músculo esquelético de ratos jovens. 92
 - Figura 4.8. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de músculo esquelético de ratos jovens. 93
 - Figura 4.9. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória em homogeneizados de músculo esquelético de ratos jovens. 94
 - Figura 4.10. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de músculo esquelético de ratos jovens. 95
 - Figura 4.11. Efeito da administração do AG sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH) em homogeneizados de músculo esquelético de ratos jovens. 96
 - Figura 4.12. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória em homogeneizados de músculo cardíaco de ratos jovens. 98
 - Figura 4.13. Efeito da administração do AG sobre a atividade do

- complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de músculo esquelético de ratos jovens. 99
- Figura 4.14. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória em homogeneizados de músculo cardíaco de ratos jovens. 100
 - Figura 4.15. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de músculo cardíaco de ratos jovens. 101
 - Figura 4.16. Efeito da administração do AG sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH) em homogeneizados de músculo cardíaco de ratos jovens. 102
 - Figura 4.17. Efeito da administração do AG sobre a atividade total da enzima creatina quinase (CK total) em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. 103
 - Figura 4.18. Efeito da administração do AG sobre a atividade total da enzima creatina quinase (CK total) em homogeneizados de músculo esquelético de ratos jovens. 104
 - Figura 4.19. Efeito da administração do AG sobre a atividade total da enzima creatina quinase (CK total) em homogeneizados de músculo cardíaco de ratos jovens. 105
 - Figura 4.20. Efeito *in vitro* do AG sobre a produção de CO₂ a partir de glicose em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. 107
 - Figura 4.21. Efeito *in vitro* do AG sobre a produção de CO₂ a partir de

- acetato em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. 108
- Figura 4.22. Efeito *in vitro* do AG sobre a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. 110
 - Figura 4.23. Efeito *in vitro* do AG sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. 111
 - Figura 4.24. Efeito *in vitro* do AG sobre a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. 112
 - Figura 4.25. Efeito *in vitro* do AG sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. 113
 - Figura 4.26. Efeito *in vitro* do AG sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH) em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. 114
 - Figura 4.27. Efeito *in vitro* do AG sobre a atividade total da enzima creatina quinase (CK total) em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. 115

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.1. Sensibilidade de marcadores diagnósticos em acidemia glutárica tipo I. 33
- Tabela 4.1. Níveis plasmáticos do AG em ratos Wistar de 7, 14 e 21 dias. 76
- Tabela 4.2. Determinação dos parâmetros farmacocinéticos do ácido glutárico em ratos de 7, 14 e 21 dias de idade. 77
- Tabela 4.3. Níveis cerebrais de AG em ratos Wistar de 7, 14 e 21 dias. 78
- Tabela 4.4. Níveis de AG em músculo cardíaco de ratos Wistar de 7, 14 e 21 dias 79
- Tabela 4.5. Níveis de AG em músculo esquelético de ratos Wistar de 7, 14 e 21 dias 80
- Tabela 4.6. Razões entre os níveis de AG encontradas nos vários tecidos e no plasma em ratos Wistar de 7 dias 81
- Tabela 4.7. Razões entre os níveis de AG encontradas nos vários tecidos e no plasma em ratos Wistar de 14 dias 81
- Tabela 4.8. Razões entre os níveis de AG encontradas nos vários tecidos e no plasma em ratos Wistar de 21 dias 82

LISTA DE ABREVIATURAS

- 3-NPA - ácido 3-nitropropiónico
- 3-OHAG - ácido 3-hidroxi-glutárico
- ADP - adenosina difosfato
- AG - ácido glutárico
- AG I - acidemia glutárica tipo I
- AMPA - alfa-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
- ANOVA - análise de variância
- ATP - adenosina trifosfato
- BSTFA - bis-trimetilsililtrifluoroacetamida
- C - córtex cerebral
- CG - cromatografia gasosa
- CG/EM - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
- CK - creatina quinase
- Clp - clearance plasmático
- CoA - coenzima A
- CoQ - coenzima Q
- COX - citocromo oxidase
- Cr - creatina
- Cy-CK - creatina quinase citosólica
- D - dose
- DCIP - dicloroindofenol

- DIC - detector de ionização em chama
- DNQX - 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona
- EDTA - ácido etileno -diamino-tetra-acético
- EIM - erro inato do metabolismo
- FAD - flavina adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
- FADH₂ - flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
- FMN - flavina mononucleotídeo
- GABA - ácido gama-aminobutírico
- GAD - glutamato descarboxilase
- GCDH - glutaril-CoA desidrogenase
- *K_m* - constante de Michaelis
- L-NAME - N ω -nitro-L-argininametiléster
- MC - músculo cardíaco
- ME - músculo esquelético
- Mi-CK - creatina quinase mitocondrial
- MS/MS - espectrometria de massa em tandem
- NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
- NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
- NMDA - N-metil-D-aspartato
- NOS - óxido nítrico sintase
- PCr - creatina-fosfato
- pHMB - ácido para-hidroximercuriobenzóico
- Pi - fosfato inorgânico

- PMS - metassulfato de fenazina
- POP - 2-difenil-oxazol
- POPOP - 1,4-bis[2-(5-feniloxazolil)benzeno]
- ROS - espécies reativas de oxigênio
- SDH - succinato desidrogenase
- SNC - sistema nervoso central
- SPSS - pacote estatístico para ciências sociais
- $t_{1/2}$ - tempo de meia-vida
- TC - tomografia computadorizada
- TCA - ácido tricloroacético
- TMS - trimetilclorosilano
- Vd - volume de distribuição

SUMÁRIO

1	<u>INTRODUÇÃO</u>	21
1.1	ERROS INATOS DO METABOLISMO	21
1.1.1	ACIDEMIAS ORGÂNICAS	23
1.1.1.1	ACIDEMIA GLUTÁRICA TIPO I	25
1.1.1.1.1	Achados clínicos	27
1.1.1.1.2	Achados neurológicos	28
1.1.1.1.3	Aspectos Moleculares	30
1.1.1.1.4	Diagnóstico	31
1.1.1.1.5	Tratamento	34
1.1.1.1.6	Fisiopatogenia	35
1.2	METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL	42
1.2.1	FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA	44
1.2.1.1	COMPLEXO I: NADH DESIDROGENASE	46
1.2.1.2	COENZIMA Q (UBIQUINONA)	47
1.2.1.3	COMPLEXO II: SUCINATO: UBIQUINONA OXIRREDUTASE	47
1.2.1.4	COMPLEXO III: COMPLEXO <i>b-c₁</i> E CITOCROMO <i>c</i>	48
1.2.1.5	COMPLEXO IV: CITOCROMO OXIDASE	48
1.2.2	BOMBEAMENTO DE PRÓTONS	49
1.2.2.1	TRANSFERÊNCIA SEQÜENCIAL DE ELÉTRONS	49
1.2.3	CREATINA QUINASE	50
1.3	MODELOS EXPERIMENTAIS	53
1.3.1	MODELOS DE ACIDEMIA GLUTÁRICA TIPO I	54
2	<u>OBJETIVOS</u>	56
2.1	GERAL	56
2.2	ESPECÍFICOS	56
3	<u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	58
3.1	REAGENTES	58
3.1.1	REAGENTES UTILIZADOS	58
3.1.2	EQUIPAMENTOS E OUTROS MATERIAIS	60
3.2	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	62
3.3	ADMINISTRAÇÃO SUBCUTÂNEA E MEDIDA DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS E TECIDUAIS DO ÁCIDO GLUTÁRICO	63
3.3.1	COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE, CÉREBRO, MÚSCULO ESQUELÉTICO E MÚSCULO CARDÍACO	64
3.3.2	QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO GLUTÁRICO	64

3.4 TRATAMENTO AGUDO COM ÁCIDO GLUTÁRICO PARA A DETERMINAÇÃO DOS DIFERENTES PARÂMETROS DO METABOLISMO ENERGÉTICO.....	67
3.5 PRODUÇÃO DE CO₂ POR HOMOGENEIZADOS DE CÉREBRO MÉDIO DE RATOS JOVENS.....	67
3.5.1 PREPARAÇÃO DOS TECIDOS.....	68
3.5.2 PRODUÇÃO DE CO ₂	68
3.6 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS COMPLEXOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA EM HOMOGENEIZADOS DE CÉREBRO MÉDIO, MÚSCULO ESQUELÉTICO E MÚSCULO CARDÍACO DE RATOS JOVENS....	69
3.6.1 PREPARAÇÃO DO TECIDO.....	69
3.6.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO I-III (NADH: CITOCROMO C OXIRREDUTASE).....	70
3.6.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO II (SUCINATO: DCIP OXIRREDUTASE) E SUCINATO DESIDROGENASE (SDH).....	71
3.6.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO II-III (SUCINATO: CITOCROMO C OXIRREDUTASE).....	71
3.6.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO IV (CITOCROMO C OXIDASE).....	72
3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CREATINA QUINASE EM HOMOGENEIZADOS DE CÉREBRO MÉDIO, MÚSCULO ESQUELÉTICO E MÚSCULO CARDÍACO DE RATOS JOVENS DE RATOS JOVENS.....	72
3.7.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	73
3.7.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	73
3.8 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA.....	74
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	74
4 RESULTADOS.....	75
4.1 INDUÇÃO DE ACIDEMIA GLUTÁRICA: DESENVOLVIMENTO DO MODELO EXPERIMENTAL.....	75
4.1.1 DETERMINAÇÃO DA DOSE DO ÁCIDO GLUTÁRICO.....	75
4.1.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE SEUS NÍVEIS PLASMÁTICOS.....	76
4.1.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDO GLUTÁRICO SOBRE SEUS NÍVEIS CEREBRAIS.....	78
4.1.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE SEUS NÍVEIS EM MÚSCULO CARDÍACO E ESQUELÉTICO.....	79
4.2 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO ÁCIDO GLUTÁRICO SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO METABOLISMO ENERGÉTICO.....	83
4.2.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE A PRODUÇÃO DE CO ₂ A PARTIR DE GLICOSE EM HOMOGENEIZADOS DE CÉREBRO MÉDIO DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE.....	83
4.2.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE A ATIVIDADE DOS COMPLEXOS ENZIMÁTICOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA EM HOMOGENEIZADOS DE CÉREBRO MÉDIO DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE.....	85

4.2.3	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE A ATIVIDADE DOS COMPLEXOS ENZIMÁTICOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA EM HOMOGENEIZADOS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE	91
4.2.4	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE A ATIVIDADE DOS COMPLEXOS ENZIMÁTICOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA EM HOMOGENEIZADOS DE MÚSCULO CARDÍACO DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE	97
4.2.5	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE A ATIVIDADE TOTAL DA CREATINA QUINASE (CK TOTAL) EM HOMOGENEIZADOS DE CÉREBRO MÉDIO DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE	103
4.2.6	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE A ATIVIDADE TOTAL DA CREATINA QUINASE (CK TOTAL) EM HOMOGENEIZADOS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE	104
4.2.7	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE A ATIVIDADE TOTAL DA CREATINA QUINASE (CK TOTAL) EM HOMOGENEIZADOS DE MÚSCULO CARDÍACO DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE	105
4.3	INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA ADIÇÃO IN VITRO DO ÁCIDO GLUTÁRICO SOBRE VÁRIOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL	106
4.3.1	EFEITO <i>IN VITRO</i> DO ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE A PRODUÇÃO DE CO ₂ A PARTIR DE GLICOSE E ACETATO EM HOMOGENEIZADOS DE CÉREBRO MÉDIO DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE	106
4.3.2	EFEITO <i>IN VITRO</i> DO ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE AS ATIVIDADES DOS COMPLEXOS ENZIMÁTICOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA EM HOMOGENEIZADOS DE CÉREBRO MÉDIO DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE	109
4.3.3	EFEITO <i>IN VITRO</i> DO ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE A ATIVIDADE TOTAL DA CREATINA QUINASE (CK TOTAL) EM HOMOGENEIZADOS DE CÉREBRO MÉDIO DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE	115
5	<u>DISCUSSÃO</u>	116
6	<u>CONCLUSÕES</u>	126
7	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	129

1 INTRODUÇÃO

1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

O termo erro inato do metabolismo (EIM) foi usado pela primeira vez por Garrod (1908) em seus estudos realizados em pacientes com alcaptonúria, doença em que os afetados excretam grandes quantidades de ácido homogentísico na urina. Garrod observou que, freqüentemente, um ou mais indivíduos da mesma família eram afetados sem que seus pais apresentassem a doença. Baseado também na observação da maior incidência de consangüinidade entre os pais dos pacientes e nas leis de Mendel, Garrod propôs um modelo de herança autossômica recessiva para este distúrbio. Através da determinação do ácido homogentísico na urina de pacientes com alcaptonúria e da observação de que esta substância era um metabólito normal da degradação da tirosina, ele relacionou este acúmulo a um bloqueio na conversão do ácido homogentísico até fumarato e acetoacetato. Verificou-se mais tarde que tais alterações resultavam da síntese qualitativa ou quantitativamente anormal de uma proteína enzimática. Atualmente, mais de 450 erros inatos do metabolismo foram descritos, a maioria deles envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Scriver *et al.*, 2001).

Pacientes portadores de algum tipo de EIM apresentam sintomatologia muito variada e inespecífica, mesmo entre aqueles que possuem o mesmo distúrbio. Essa variação fenotípica deve-se a diferentes graus de deficiência enzimática, áreas do metabolismo envolvidas e tecidos afetados, podendo variar de episódios

de vômitos e diarreia até acometimento do SNC, com retardo neuropsicomotor e neurodegeneração progressiva (Burton, 1987).

Sinclair (1982), classificou os EIM em quatro grupos, dependendo da função exercida pela enzima deficiente e do tecido envolvido, bem como dos aspectos clínicos, bioquímicos, patológicos e terapêuticos:

1) *Desordens de transporte*: afetam basicamente o transporte renal e/ou intestinal de moléculas orgânicas ou inorgânicas. Exemplos: deficiências de dissacaridases, defeito no transporte de magnésio e Doença de Hartnup.

2) *Desordens de armazenamento, degradação e secreção*: envolvem proteínas de organelas celulares como o aparelho de Golgi ou os lisossomas. Ocorre o acúmulo de macromoléculas em tecidos específicos. Exemplos: doenças lisossômicas de depósito, glicogenoses e cistinose.

3) *Desordens de síntese*: deficiência na síntese de proteínas ou outras substâncias com funções importantes tais como hormônios, proteínas plasmáticas e de defesa imunológica. Exemplos: hiperplasia adrenal congênita por deficiência da enzima 21-hidroxilase da rota da síntese do cortisol.

4) *Desordens do metabolismo intermediário*: caracterizam-se por deficiências enzimáticas das rotas do metabolismo intermediário de moléculas pequenas, comprometendo importantes rotas, como o ciclo do ácido tricarboxílico, o ciclo da uréia, ou outras rotas. Assim, o substrato da enzima deficiente se acumula e, a

menos que haja uma rota alternativa para metabolizá-lo, o produto final da reação não será formado. Os mecanismos de injúria podem ocorrer pela ação do substrato acumulado que pode ser tóxico, levando a alterações bioquímicas e danos em determinados tecidos por ser liberado na circulação e transportado para todo o organismo, por seus metabólitos ou pela falta de substâncias essenciais ao desenvolvimento do organismo, causada pelo bloqueio metabólico. Considerados os mais freqüentes EIM, essas desordens têm como exemplo as acidúrias orgânicas, as aminoacidopatias, as desordens do metabolismo das purinas e pentoses, e outros.

1.1.1 ACIDEMIAS ORGÂNICAS

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

Devido ao desconhecimento da classe médica, pela falta de laboratórios especializados e pela dificuldade de diagnóstico, a freqüência destas doenças na população em geral é pouco conhecida. Na Holanda, país considerado referência para o diagnóstico de erros inatos do metabolismo, a incidência destas doenças é

estimada em 1: 2.200 habitantes, enquanto que na Alemanha, Israel e Inglaterra é de aproximadamente 1:6.000 – 1:9.000 recém-nascidos (Hoffmann *et al.*, 2004). Na Arábia Saudita, onde a taxa de consangüidade é elevada, a freqüência é de 1: 740 nascidos vivos (Rashed *et al.*, 1994).

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

Clinicamente os pacientes afetados apresentam, como sintomatologia mais comum, disfunção neurológica em suas diversas formas de expressão: regressão neurológica, convulsões, coma, ataxia, hipotonia, hipertonia, irritabilidade, tremores, movimentos coreatetóticos, tetraparesia espástica, atraso no desenvolvimento psicomotor e outros. As mais freqüentes manifestações laboratoriais são cetose, cetonúria, neutropenia, trombocitopenia, acidose metabólica, baixos níveis de bicarbonato, hiperglicinemia, hiperglicinúria, hiperamonemia, hipo/hiperglicemia, acidemia láctica, aumento dos níveis séricos de ácidos graxos livres, bem como cheiro peculiar na urina e/ou suor e outros (Scriver *et al.*, 2001). Com a utilização da tomografia computadorizada e ressonância magnética nuclear, foram verificadas freqüentemente alterações de substância branca (hipomielização e/ou desmielização), atrofia cerebral generalizada ou de gânglios da base (necrose ou calcificação), megaencefalia, atrofia frontotemporal e atrofia cerebelar em pacientes afetados por estas doenças (Mayatepek *et al.*, 1996).

1.1.1.1 ACIDEMIA GLUTÁRICA TIPO I

A acidemia glutárica tipo I (AG I) (MIM 231670) é um erro inato do metabolismo, que foi descrito inicialmente por Goodman e colaboradores (1975) quando observaram que dois irmãos apresentavam alterações severas dos movimentos e acidose metabólica intermitente. Caracterizada bioquimicamente pela deficiência severa da atividade da enzima glutaril-CoA desidrogenase (GCDH) (EC 1.3.99.7) da via catabólica dos aminoácidos L-lisina, hidróxi-L-lisina e L-triptofano (Christensen & Brandt, 1978), apresenta-se como uma acidemia orgânica cerebral, pois os sintomas são quase exclusivamente neurológicos (Hoffman *et al.*, 1993a, 1994). A GCDH é uma flavoproteína mitocondrial de 43.3 KDa constituída como um homotetrâmero com cada uma das subunidades contendo uma molécula de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) ligada não-covalentemente (Goodman *et al.*, 1995). A reação catalisada por esta enzima ocorre em duas fases consecutivas: na primeira, a enzima atua como uma desidrogenase formando o composto intermediário glutaconil-CoA e, na seqüência, como uma descarboxilase, onde os produtos da reação desta enzima são crotonil-CoA e CO₂. O composto intermediário glutaconil-CoA, pode ser clivado e excretado como ácido glutacônico ou hidratado para 3-hidroxi-glutaril-CoA (Figura 1.1). Esta última reação é catalisada pela enzima 3-metilglutaconil-CoA hidratase mitocondrial (Hoffmann & Zschocke, 1999).

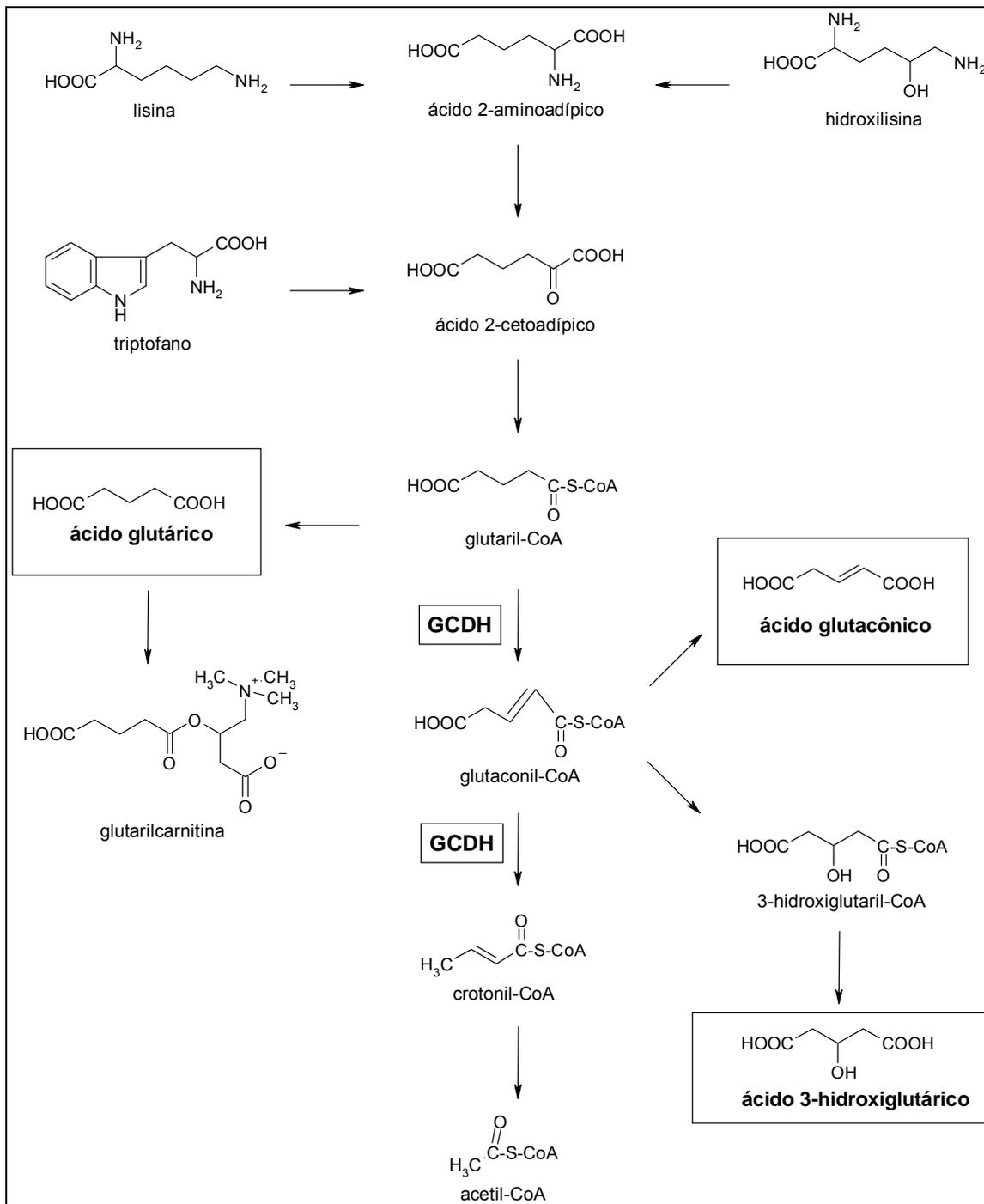


Figura 1.1. Via catabólica dos aminoácidos lisina, hidroxilisina e triptofano. A GCDH é responsável por dois passos desta via: a desidrogenação de glutaril-CoA a glutaconil-CoA e a descarboxilação de glutaconil-CoA a crotonil-CoA.

Em indivíduos com AG I, tanto a desidrogenação de glutaril-CoA como a descarboxilação de glutaconil-CoA para crotonil-CoA estão bloqueadas (Christensen, 1993; Liesert *et al.*, 1999). Este bloqueio causa um acúmulo de ácido glutárico (AG) e ácido 3-hidroxi glutárico (3-OHAG) e, algumas vezes, de ácido glutacônico nos tecidos e fluidos corporais (plasma, urina e líquido) dos pacientes afetados (Goodman *et al.*, 1977; Baric *et al.*, 1998), assim como glutaril-CoA e os conjugados de carnitina principalmente no plasma e líquido. As concentrações séricas destes ácidos orgânicos usualmente encontradas na doença ficam entre 5 e 400 μM (Hoffmann *et al.*, 1991, 1996; Merinero *et al.*, 1995) mas podem alcançar valores consideravelmente maiores no cérebro (até 8 mM) durante as crises encefalopáticas (Kölker *et al.*, 2004).

A AG I é uma das mais freqüentes desordens do metabolismo dos ácidos orgânicos (Kölker *et al.*, 2000b), tendo sua prevalência estimada em 1:30.000 recém-nascidos (Scriver *et al.*, 2001) e podendo estar bastante aumentada (1:3.000) em comunidades geneticamente homogêneas como ocorre na Pensilvânia (Biery *et al.*, 1996) ou nos índios de Salteaux/Ojibway no Canadá (Haworth *et al.*, 1991; Greenberg *et al.*, 1995).

1.1.1.1.1 Achados clínicos

O quadro clínico dos pacientes com AG I é heterogêneo e o curso da doença parece ser seguido por diferentes padrões em diferentes idades. Durante os primeiros meses de vida, os sintomas geralmente são leves. Alguns pacientes desenvolvem-se normalmente, enquanto outros podem apresentar hipotonia e

atraso progressivo no desenvolvimento. Antes das crises encefalopáticas, o mais importante achado clínico dos pacientes é a macrocefalia progressiva (Hoffmann *et al.*, 1995). Entre os 3 e 36 meses de vida, uma encefalopatia aguda, que pode ser desencadeada por imunizações de rotina, doenças intercorrentes ou cirurgias, acaba levando a uma marcada degeneração estriatal. As crises encefalopáticas nestes pacientes usualmente duram poucos dias, mas cada episódio determina morte neuronal intensa com perda posterior de habilidades motoras previamente adquiridas, causando o aparecimento de muitos sintomas neurológicos (como movimentos distônicos e discinéticos), além de manifestações de hipotonia, opistótono, perda do controle do tronco e da cabeça, além de convulsões e coma. O mais comum, no entanto, é que a maioria dos pacientes sofra apenas um único episódio encefalopático (Superti-Furga & Hoffmann, 1997).

1.1.1.1.2 Achados neurológicos

A acidemia glutárica tipo I pode ser vista como uma síndrome de malformação cerebral tanto quanto uma desordem metabólica. O prejuízo no desenvolvimento do SNC já se inicia no útero e pode, em alguns pacientes, resultar em malformações ao nascimento. Após a trigésima semana de gestação, a maior parte das crianças afetadas mostra desenvolvimento de hidrocefalia e são freqüentemente macrocefálicas ao nascimento. O desenvolvimento dos lobos frontal e particularmente dos lobos temporais é atrofiado (operculização reduzida ou atrofia frontotemporal) (Hoffmann & Zschocke, 1999). Apesar do termo atrofia

frontotemporal ser rotineiramente empregado, ainda é desconhecido se os pequenos lobos temporais são atróficos ou hipoplásticos.

Achados neuroradiológicos mostram também um alargamento dos espaços subaracnóides da região frontotemporal e uma difusa atenuação da substância branca periventricular (Drigo *et al.*, 1996; Pineda *et al.*, 1998). A significância clínica do alargamento dos espaços com fluido subdural em crianças com AG I é que estes espaços são atravessados por uma sutil rede de veias, o que as tornam mais propensas a sofrerem hemorragias agudas subdurais, incluindo hemorragias após traumas de pequena intensidade na cabeça (Hoffmann & Zschocke, 1999).

Exames de tomografia computadorizada (TC) são usualmente anormais, mostrando dilatação dos ventrículos laterais e aumento do sulco cortical freqüentemente observados nos primeiros dias do início dos sintomas neurológicos (Dunger & Snodgrass, 1984; Stutchfield *et al.*, 1985).

Os núcleos da base, além dos lobos temporais e frontal, são as estruturas mais afetadas e que, quando atingidas, causam permanente alterações motoras nos pacientes, como distonia e discinesia (Kölker *et al.*, 2000b). Esses pacientes apresentam perda neuronal severa, fibrose dos núcleos do caudado e putâmen e degeneração do globo pálido.

Sucedendo o dano nos gânglios da base, os pacientes seguem um curso pseudo-estacionário da doença. Através dos anos que seguem, eles freqüentemente sofrem lento envolvimento progressivo da substância branca (hipomielinização ou desmielinização) e de estruturas cerebrais, com regressão na freqüência de episódios encefalopáticos adicionais, principalmente associados com eventos catabólicos. O intelecto é inicialmente poupado, mas pode tornar-se

progressivamente diminuído. Sinais do trato piramidal e espasticidade também podem ocorrer. Dificuldades na deambulação e distúrbios do controle da temperatura corporal são as principais seqüelas, podendo os pacientes sucumbir para crises com hiperpiréxia (Hoffmann & Zschocke, 1999).

As concentrações do ácido γ -aminobutírico (GABA) apresentam-se extremamente baixas no caudado (0,60 $\mu\text{mol/g}$ de peso seco, normal=3,03 $\mu\text{mol/g}$) e também no putâmen (0,87 $\mu\text{mol/g}$ de peso seco, normal = 5,69 $\mu\text{mol/g}$), e a atividade da enzima responsável pela biossíntese de GABA (glutamato descarboxilase) encontra-se diminuída nestes tecidos (Leibel *et al.*, 1980).

1.1.1.1.3 Aspectos Moleculares

O gene da GCDH está localizado no cromossomo 19p13.2, contém 11 éxons e mede 7kb. Ele codifica uma proteína de 438 aminoácidos que inclui uma seqüência alvo N-terminal de 44 aminoácidos, que é clivada depois de importada para a matriz mitocondrial. A proteína madura de 43.3 kD forma um homotetrâmero, com cada subunidade contendo uma simples molécula de flavina adenina dinucleotídeo (Goodman *et al.*, 1995). Enzima chave da rota catabólica dos aminoácidos triptofano, lisina e hidroxilisina, a GCDH catalisa a descarboxilação oxidativa de glutaril-CoA a crotonil-CoA e CO_2 . A maioria das mutações causadoras da doença conhecidas (aproximadamente 100) são mudanças simples de bases que, freqüentemente, estão localizadas no sítio hipermutável CpG do gene GCDH. A deficiência de GCDH é bastante heterogênea, e a maior parte dos pacientes é heterozigoto para duas diferentes

mutações. A mais freqüente das mutações em caucasianos é a R402W, que acomete entre 10 e 20% dos alelos (Goodman *et al.*, 1998; Busquets *et al.*, 2000; Zschocke *et al.*, 2000).

1.1.1.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico precoce de AG I, assim como de outras acidemias orgânicas, é extremamente importante pois a possibilidade de um tratamento eficaz, que possa retardar ou até mesmo evitar manifestações neurológicas irreversíveis, está intimamente ligada à rapidez do diagnóstico. Tal procedimento pode permitir que o afetado pela doença permaneça com um quadro clínico estável e, algumas vezes, com condições normais de vida.

Na maioria dos casos, o diagnóstico de AG I é obtido através do aumento da excreção urinária dos ácidos glutárico (AG) e 3-hidroxi glutárico (3-OHGA), e algumas vezes, do ácido glutacônico pelos pacientes. A identificação destes compostos é feita por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (Hoffmann *et al.*, 1993, Hoffmann, 1994) e a presença do ácido 3-hidroxi glutárico é fundamental para diferenciar a acidemia AG I da acidemia glutárica tipo II e de outras acidemias (Bennett *et al.*, 1991). Este diagnóstico discriminativo pode ser aprimorado pela quantificação do 3-hidroxi glutárico por um ensaio de diluição do isótopo estável na urina (Hoffmann & Zschocke, 1999). Em alguns casos, a confirmação do diagnóstico é feita através da medida da atividade enzimática em fibroblastos de pacientes.

Outro importante método complementar de diagnóstico é a análise do perfil de acilcarnitinas, onde podem ser observadas elevações de glutarilcarnitina, além de uma diminuição dos níveis de carnitina livre, através de espectrometria de massas em tandem MS/MS nos líquidos biológicos (Ziadeh *et al.*, 1995). Esta tecnologia aplicada a sangue em papel filtro tem sido recentemente implementada em programas de triagem neonatal. Todavia, convém enfatizar que a precisão do diagnóstico específico para a detecção de AG I por análises de acilcarnitinas em pacientes com achados bioquímicos atípicos é inferior à análise quantitativa do ácido 3-OH-glutárico na urina (Hoffmann & Zschocke, 1999). Outro método que pode auxiliar no diagnóstico é a análise mutacional, porém, devido ao grande número de mutações conhecidas, este método tem um melhor aproveitamento em comunidades fechadas, onde as mutações se repetem em uma maior proporção.

Em alguns casos, pacientes com AG I podem apresentar excreção pouco elevada ou intermitente, ou até mesmo excreção normal do ácido glutárico (Bergman *et al.*, 1989; Campistol *et al.*, 1992; Merinero *et al.*, 1995; Hoffmann, 1996). Pacientes com níveis normais de ácido glutárico tendem também a ter níveis normais de glutarilcarnitina (Baric *et al.*, 1998) e, nestes casos, a atividade da enzima GCDH em fibroblastos (ou leucócitos) serve como parâmetro de diagnóstico e deve ser medida sempre que a condição for fortemente suspeita por achados clínicos e/ou neuro-radiológicos (Scriver *et al.*, 2001). A medida da atividade da enzima glutaril-CoA desidrogenase pode ser feita pela descarboxilação de (1,5-¹⁴C) glutaril-CoA (Goodman *et al.*, 1975) ou pela liberação de trício de (2,3,4-³H) glutaril-CoA em fibroblastos (Hyman & Tanaka, 1984).

Não há, até o momento, nenhuma correlação adequada entre genótipo e fenótipo clínico, de forma que a determinação da mutação alterada não orienta o prognóstico dos pacientes afetados (Goodmann *et al.*, 1998; Hoffmann & Zschocke, 1999) e a severidade dos sintomas nem sempre está correlacionada com a atividade residual da enzima. Por outro lado, há um relato de correlação entre genótipo e fenótipo bioquímico em que mutações específicas com significativa atividade residual da enzima podem estar associadas com baixa excreção de metabólitos em pacientes heterozigotos que expressam uma severa mutação em um dos alelos (Christensen *et al.*, 2004).

Em resumo, apesar da análise de ácidos orgânicos na urina ser fundamental para o diagnóstico de AG I, a análise enzimática de glutaril-CoA desidrogenase e a análise de mutações são métodos complementares para estabelecer o diagnóstico de AG I (Tabela 1.1).

Tabela 1.1. Sensibilidade de marcadores diagnósticos em acidemia glutárica tipo I

Tipo de ensaio	% de sensibilidade
Ensaio de glutaril-CoA desidrogenase	≥ 99%
Análises de mutação	≥ 99%
Quantificação do ácido 3-OH glutárico	≥ 98%
Análise de acilcarnitina	≥ 97%
Quantificação do ácido glutárico	> 95%

* Fonte: Hoffmann & Zschocke, 1999.

1.1.1.1.5 Tratamento

O tratamento dos pacientes com AG I baseia-se na restrição de lisina, hidroxilisina e triptofano da dieta e administração de L-carnitina e riboflavina. Além disso, o tratamento nas crises agudas, após as infecções, consiste na administração de líquidos para evitar desidratação, ingesta hipercalórica para controlar o catabolismo e outras medidas gerais. A administração de insulina, glicose e bicarbonato também pode prevenir ou diminuir o dano estriatal durante estes episódios, por inibir o catabolismo e a acidose severa.

Devido à inibição da glutamato descarboxilase neuronal e às baixas concentrações de GABA nos gânglios da base dos pacientes (Leibel *et al.*, 1980), apregoa-se o tratamento com agentes farmacológicos como o baclofen, o ácido valpróico e a vigabatrina que elevam as concentrações de GABA. No entanto, os efeitos deste tratamento medicamentoso são muito heterogêneos. Enquanto alguns pacientes não respondem ao tratamento com baclofen (Bennett *et al.*, 1986), outros apresentam uma melhora (Brandt *et al.*, 1979). O baclofen inicialmente era considerado um ativador de receptores GABAérgicos, mas outros estudos demonstraram que ocorre a ativação de neurônios que normalmente são inibidos pelo neurotransmissor GABA (Fukuda *et al.*, 1977).

O tratamento com o ácido valpróico tem sido aplicado com sucesso em alguns pacientes, pois este composto leva a um aumento seletivo de GABA nas sinapses (através da inibição da GABA transaminase ou da semialdeído succinil desidrogenase, enzimas que metabolizam o GABA, ou ainda pela inibição da captação de GABA pelas células gliais e terminais nervosos) (Stutchfield *et al.*,

1985). Enfatiza-se no entanto que, se o dano estriatal se estabelecer após uma ou mais crises encefalopáticas, o tratamento posterior poderá ser insatisfatório, realçando então a importância de prevenir a instalação das crises encefalopáticas.

Recentemente, foi proposto um tratamento com drogas anticolinérgicas, como triexifenidil, e com toxina botulínica para minimizar a discinesia e distonia encontradas em pacientes após as crises encefalopáticas. Os resultados foram aparentemente satisfatórios, porém mais estudos serão necessários para avaliar a exata contribuição deste tratamento, como medida terapêutica auxiliar em pacientes afetados pela AG I (Burlina *et al.*, 2004).

1.1.1.1.6 Fisiopatogenia

A GCDH é uma enzima que atua em duas etapas consecutivas no catabolismo dos aminoácidos lisina, hidroxilisina e triptofano, sendo responsável tanto pela desidrogenação de glutaril-CoA a glutaconil-CoA, quanto pela descarboxilação de glutaconil-CoA a crotonil-CoA. A hidrólise destes compostos (glutaril-CoA e glutaconi-CoA) levará à formação dos ácidos glutárico, que ainda pode ser conjugado a L-carnitina formando glutarilcarnitina, e glutacônico, importantes metabólitos acumulados na deficiência desta enzima (Hoffmann *et al.*, 1991). Além destes, outro importante metabólito que tem sido apontado como sendo neurotóxico nesta doença é o ácido 3-hidroxi-glutárico, cuja origem intracelular ainda é desconhecida. Apesar de várias rotas metabólicas terem sido apontadas para a formação deste composto, é consenso que este processo deva envolver três etapas: (1) a formação de glutaconil-CoA (por desidrogenases

mitocondriais, glutaril-CoA oxidase peroxissomal ou pela GCDH em pacientes com mutações cuja atividade como desidrogenase desta enzima esteja menos afetada que sua atividade como descarboxilase); (2) formação de 3-hidroxi-glutaril-CoA (por uma hidratação inespecífica do ácido glutacônico pela enzima 3-metilglutaconil-CoA hidratase) e (3) formação do ácido 3-hidroxi-glutárico (pela hidrólise de 3-hidroxi-glutaril-CoA) (Liesert *et al.*, 1999).

A GCDH possui uma alta atividade no fígado e rim, e uma baixa atividade no músculo esquelético, músculo cardíaco e tecido cerebral de ratos e camundongos (McMillan *et al.*, 1988; Woontner *et al.*, 2000). Considerando somente as diferentes regiões cerebrais em animais normais, sua atividade é menor no córtex e no estriado, indicando que o dano neuronal característico de pacientes afetados pela AG I e a atividade da GCDH região-específica estão inversamente correlacionados (Woontner *et al.*, 2000).

Em pacientes afetados por AG I, a atividade da GCDH varia de 0 a 10% da atividade normal em fibroblastos cultivados, amniócitos, leucócitos periféricos, fígado, rins e cérebro. O grau de deficiência na atividade da enzima nem sempre está correlacionado com a severidade dos sintomas, possivelmente porque, na patogenia desta doença, o número e a severidade das manifestações intercorrentes (crises encefalopáticas), bem como a quantidade de proteínas na dieta, possuem fundamental papel. Ainda hoje, os mecanismos da disfunção estriatal e degeneração neuronal, principalmente dos gânglios da base, permanecem desconhecidos.

Muitos trabalhos têm demonstrado os efeitos neurotóxicos dos ácidos glutárico e 3-hidroxi-glutárico. Inicialmente, foi demonstrado que o ácido glutárico é

tóxico em cultura de células estriatais (Whetsell, 1984), porém imagina-se que o ácido 3-OHAG seja a principal neurotoxina acumulada na AG I (Kölker *et al.*, 2000a), atuando como excitotoxina principalmente por interação com receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Esta interação seria especificamente sobre as subunidades NR1/NR2B destes receptores e a extensão da neurotoxicidade seria dependente da expressão destas subunidades durante a maturação neuronal ao longo do desenvolvimento. Posteriormente, foi demonstrado que o 3-OHAG atuaria como um agonista de receptores NMDA, porém com um efeito estimulatório menor, quando comparado a glutamato (Rosa *et al.*, 2004). Tais estudos reforçam a hipótese de que o dano neuronal observado na AG I pode ocorrer por uma alta expressão dos receptores NR1/NR2B no cérebro anterior (córtex e estriado) durante um período vulnerável do desenvolvimento cerebral (Standaert *et al.*, 1994; Kosinski *et al.*, 1998). Acredita-se que concentrações muito altas de 3-OH-AG e AG sejam necessárias para a indução de crises encefalopáticas agudas na AG I durante esse período. Por outro lado, concentrações altas mas subtóxicas de 3-OH-AG ou AG não causariam uma doença excitotóxica mas um *down-regulation* dos receptores NR1/2B *in vitro*, induzindo um atraso na maturação neuronal (Resink *et al.*, 1996; Herkert *et al.*, 1998).

Vários fatores exógenos e endógenos podem precipitar crises encefalopáticas agudas nos pacientes afetados por AG I. No entanto, após 5-6 anos de vida, nenhuma crise encefalopática aguda ocorre no cérebro maduro que é composto predominantemente pelos receptores do subtipo NR2A (Kölker *et al.*, 2000a). Por outro lado, foi demonstrado que os processos axonais são

enriquecidos de subunidades NR2B em cérebro de ratos neonatais (Herkert *et al.*, 1998), fortalecendo esta teoria.

Outros mecanismos excitotóxicos podem provavelmente levar à degeneração neuronal na AG I como a inibição competitiva da glutamato descarboxilase (GAD), enzima responsável pela biossíntese do ácido δ -aminobutírico (GABA), causada por AG, 3-OHAG e ácido glutacônico (Stokke *et al.*, 1976), com a resultante diminuição na formação intracelular de GABA (Leibel *et al.*, 1980).

Por outro lado, também tem sido atribuído ao AG um papel na excitotoxicidade ao SNC. Foi visto que este ácido provocou dano celular a culturas organotípicas cortico-estriatais (Whetsell & Schwarcz, 1983), inibição da captação de glutamato por sinaptossomas de ratos e da ligação de glutamato a seus transportadores em córtex cerebral de ratos, sugerindo que o ácido se ligaria aos sítios transportadores de glutamato (Porciúncula *et al.*, 2000). Foi também verificado que o AG em baixas concentrações estimula receptores de glutamato metabotrópicos e ionotrópicos do tipo AMPA, não alterando a ligação a receptores do tipo NMDA e kainato (Porciúncula *et al.*, 2004). Este resultado explicaria o fato que convulsões tônico-clônicas provocadas por injeções intraestriatais deste ácido foram prevenidas por DNQX, um antagonista de receptores AMPA, mas não por MK-801, um antagonista de receptores NMDA (Lima *et al.*, 1998). Por último, foi demonstrado que AG inibe a captação de glutamato em vesículas sinápticas de córtex cerebral, indicando que poderia estar havendo um prejuízo no *turnover* de glutamato da fenda sináptica e no ciclo glutamato-glutamina entre astrócitos e

neurônios. Essas alterações podem resultar em um aumento nos níveis de glutamato na fenda sináptica e diminuição dos níveis de GABA, possivelmente levando à excitotoxicidade. Neste sentido, convém enfatizar que concentrações reduzidas de GABA foram detectadas nos gânglios da base de pacientes afetados por AG I (Leibel *et al.*, 1980).

No entanto, recentemente dois grupos de pesquisa independentes demonstraram que o 3-OHAG não se mostrou excitotóxico em cultura primária de neurônios de cérebro de ratos neonatos e de neurônios neocorticais (Bjugstad *et al.*, 2001; Lund *et al.*, 2004). Estes grupos preconizam que o 3-OHGA deva ser neurotóxico através de outros mecanismos que não a excitotoxicidade. Portanto, em busca de mecanismos acessórios que pudessem explicar, ao menos em parte, as características alterações neurológicas em pacientes afetados por AG I, foi investigado o papel do estresse oxidativo na fisiopatologia desta doença. Foi demonstrado que o tratamento *in vitro* com 3-OHAG em cultura neuronal de pinto induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a qual foi prevenida pela co-incubação com MK-801, um antagonista de receptores NMDA, ou pelos seqüestradores de radicais livres (antioxidantes) α -tocoferol ou melatonina. Também foi demonstrada uma maior produção de óxido nítrico, porém o tratamento com L-NAME, que é um inibidor da óxido nítrico sintase (NOS), não evitou a morte neuronal, indicando que outros mecanismos além do óxido nítrico são responsáveis pela mesma (Kölker *et al.*, 2001a). Por outro lado, foi observado um aumento na expressão da enzima óxido nítrico sintase em culturas de hipocampo de ratos quando as células foram tratadas com 3-OHAG juntamente

com interleucina-1 β e interferon- δ por 24 hs, mas este efeito não foi observado quando as citocinas inflamatórias foram incubadas separadamente. Estes resultados indicam uma potencialização da neurotoxicidade do 3-OHAG pela indução da NOS e uma participação do sistema neuro-imunológico inflamatório nas crises encefalopáticas agudas características desta doença (Kölker *et al.*, 2001b). Foi também demonstrado que o 3-OHAG e o AG diminuem as defesas antioxidantes, induzem peroxidação lipídica e formação de espécies reativas, particularmente de óxido nítrico, em córtex cerebral e estriado de ratos jovens (Latini *et al.*, 2002, 2005; de Oliveira Marques *et al.*, 2003). Em conjunto, estas evidências sugerem fortemente que um desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes deve estar envolvidos na fisiopatogenia da AG I.

Os efeitos dos metabólitos acumulados na AG I sobre o metabolismo energético, principalmente o AG e 3-OHAG, também têm sido alvo de estudos, porém os resultados são poucos e, algumas vezes, conflitantes. Foi demonstrado que altas concentrações de 3-OHGA inibem as atividades dos complexos II e V da cadeia respiratória e o *pool* de fosfocreatina *in vitro* (Ullrich, *et al.*, 1999; Das *et al.*, 2003). Entretanto, foi demonstrado que mesmo concentrações maiores do que 5 mM do 3-OHGA não alteraram o conteúdo de ATP de fatias cortico-estriatais (Flott-Rhamel *et al.*, 1997). Além disso, este ácido não teve efeito sobre as atividades dos complexos I e V da cadeia respiratória em partículas submitocondriais de coração bovino (Kölker *et al.*, 2002b). Em relação ao AG, os resultados são ainda mais contraditórios. Foi demonstrada uma inibição da atividade dos complexos I-III e II-III da cadeia respiratória, bem como uma

diminuição da produção de CO₂ e dos níveis de ATP em córtex de ratos jovens (Silva *et al.*, 2000). Tais resultados, porém, são diferentes de outros trabalhos realizados, que não encontraram nenhum efeito deste ácido sobre as atividades isoladas dos complexos I-V da cadeia respiratória em coração bovino (Kölker *et al.*, 2002a), indicando que o AG não inibe o metabolismo energético. Uma redução da atividade da enzima Na⁺, K⁺-ATPase por este ácido foi também descrita em córtex cerebral de ratos, sendo prevenida por antioxidantes (Kölker *et al.*, 2002a).

Além dos efeitos do AG e 3-OHAG, estima-se que glutaril-CoA possa inibir múltiplas enzimas mitocondriais e transportadores, ou atuar como um inibidor competitivo de rotas como o ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Acredita-se também que outros metabólitos acumulados na AG I, como glutarilcarnitina e ácido glutacônico também possam estar envolvidos na fisiopatogenia desta doença, mas tais hipóteses não passam de suposições.

Outros mecanismos propostos para explicar a neurodegeneração na AG I apontam para um disfunção vascular (alteração da permeabilidade e diminuição da integridade vascular) causada pelo ácido 3-OHAG (Mühlhausen *et al.*, 2004), bem como o envolvimento do ácido quinolínico, um metabólito da via catabólica do triptofano (Heyes, 1987; Varadkar & Surtees, 2004). Tais resultados porém foram inconclusivos, visto que, até o presente momento, ainda não foi confirmado um aumento das concentrações do ácido quinolínico e de outros metabólitos da via das quinureninas em pacientes afetados por esta doença.

Concluindo, a fisiopatogenia das alterações neurológicas característica de pacientes afetados pela AG I parece ser explicada, ao menos em parte, por um desequilíbrio entre os sistemas GABAérgico e glutamatérgico no SNC, e

especificamente nas áreas mais afetadas nesta doença como córtex cerebral e núcleos da base (Wajner *et al.*, 2004), bem como pela indução de radicais livres. O papel dos metabólitos acumulados na AG I sobre o metabolismo energético cerebral ainda não está bem estabelecido e necessita ser melhor estudado. Neste sentido, uma disfunção mitocondrial pode ser um evento importante na fisiopatogenia da doença, resultando em eventos celulares interligados (excitotoxicidade, deficiências no metabolismo energético e formação de ROS). A instalação de um destes processos facilitaria e amplificaria o surgimento dos outros, explicando, assim, o extenso dano neurológico dos pacientes afetados por esta doença.

1.2 METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL

O cérebro possui uma intensa atividade metabólica, no entanto suas reservas energéticas são extremamente pequenas em relação à sua demanda. Assim, há a necessidade de substratos energéticos para o cérebro de mamíferos, sendo a glicose o principal deles onde, em contraste com outros tecidos, não necessita de insulina para ser captada e oxidada (Dickinson, 1996). No entanto, o padrão de utilização deste nutriente varia conforme a etapa de desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), o estado nutricional do indivíduo e o destino de sua cadeia de átomos de carbono (Marks *et al.*, 1996). Por exemplo, o lactato é a principal fonte de obtenção de energia cerebral após o nascimento (Vicario *et al.*, 1991). Quando inicia o período de amamentação, já começa uma utilização de

grandes quantidades de corpos cetônicos, que são formados a partir da oxidação dos ácidos graxos contidos no leite materno, sendo uma importante fonte de energia para o cérebro nas primeiras semanas de vida. Neste período, o consumo de glicose pelo cérebro está reduzido, sendo aumentado em poucas semanas durante o desenvolvimento, até por volta dos 18 dias de vida, quando a utilização de glicose se torna preferencial em condições normais (Crone, 1965; Cremer *et al.*, 1976). Essa utilização também pode ser modulada por padrões nutricionais, como, por exemplo, situações de jejum prolongado, onde o SNC utiliza corpos cetônicos.

O ciclo do ácido cítrico é a via comum de oxidação dos glicídios, aminoácidos e ácidos graxos (aproximadamente 95% do ATP sintetizado). O metabolismo energético cerebral se mostra essencialmente aeróbico, sendo a glicose o principal substrato utilizado (Clark *et al.*, 1993), entrando no ciclo sob a forma de acetil-CoA, que é então oxidada completamente a CO₂. As reações anapleróticas, que alimentam o ciclo fornecendo diretamente seus intermediários, também fornecem substratos para as reações de oxidação no cérebro. Quando não há hipóxia, a fosforilação oxidativa é dependente da concentração de ATP, ADP e fosfato inorgânico (Pi) e da razão mitocondrial de NADH/NAD⁺, que é determinada pela atividade da cadeia transportadora de elétrons e pela transferência de elétrons provenientes de reações catalisadas por enzimas mitocondriais. A cadeia transportadora de elétrons oxida o NADH e bombeia prótons para o espaço intermembrana da mitocôndria formando assim um gradiente de prótons que através da passagem pela ATP-sintase, produz ATP na fosforilação oxidativa (Erecinska & Silver, 1994).

Outro importante sistema que auxilia a manutenção dos níveis cerebrais de ATP é o da creatina quinase, que está presente tanto no citosol quanto ligada às membranas mitocondriais e catalisa a transferência reversível de um grupamento fosfato entre a fosfocreatina e o ATP. Esse sistema tem sido associado a algumas funções particularmente importantes para o cérebro, como tamponamento energético (através da regeneração do ATP e da manutenção de níveis baixos de ADP) e transferência de ATP de sítios de produção para outros de consumo (Erecinska & Silver, 1994).

1.2.1 FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

Fosforilação oxidativa é o processo mais importante do metabolismo de produção energética em organismos aeróbicos. Todos os passos da degradação de carboidratos, lipídeos e aminoácidos convergem para este estágio final da respiração celular em que os elétrons provenientes do NADH e FADH₂ dirigem a síntese de ATP. Em eucariotos, a fosforilação oxidativa ocorre nas mitocôndrias e envolve a redução do O₂ a H₂O com elétrons doados por NADH ou FADH₂, que fluem por vários pares redox (cadeia respiratória) ocorrendo concomitante produção de ATP a partir de ADP + Pi. Nosso atual entendimento de síntese de ATP está baseado na hipótese introduzida por Peter Mitchel em 1961, que diz que diferenças transmembrana na concentração de prótons são o reservatório da energia extraída de reações de oxidação biológica, e é conhecida como a teoria quimiosmótica (Nelson & Cox, 2004).

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

Como mostra a Figura 1.2, a cadeia respiratória possui vários complexos protéicos: NADH desidrogenase (complexo I), succinato: ubiquinona oxirredutase (complexo II), complexo citocromo b-c₁ (complexo III) e citocromo oxidase (complexo IV), além de elementos móveis que se localizam entre os complexos. São eles a coenzima Q (CoQ), um componente não protéico lipossolúvel que carrega elétrons entre os complexos I e III, e o citocromo c, uma pequena proteína localizada na face externa da membrana que transfere os elétrons do complexo III para o complexo IV (Marks *et al.*, 1996).

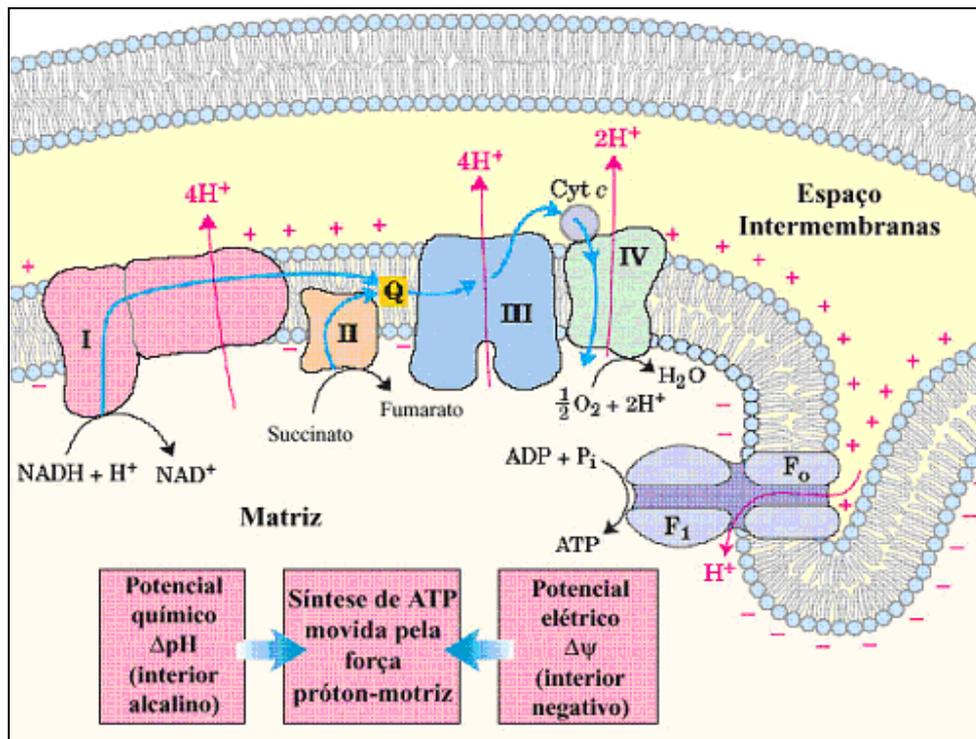


Figura 1.2. Fluxo de elétrons através dos quatro complexos da cadeia respiratória. O gradiente eletroquímico transmembrana formado possibilita a síntese de ATP pela ATP-sintase (adaptado de Nelson & Cox, 2004).

1.2.1.1 COMPLEXO I: NADH DESIDROGENASE

O complexo I contém flavina mononucleotídeo (FMN) e centros ferro-enxofre (Fe-S). FMN recebe elétrons do NADH e é capaz de transferi-los aos centros Fe-S. O NADH é reoxidado a NAD^+ e retorna para o ciclo de Krebs ou para outras rotas metabólicas para receber elétrons. Os centros Fe-S estão envolvidos na transferência de elétrons para a CoQ (Marks *et al.*, 1996).

1.2.1.2 COENZIMA Q (UBIQUINONA)

A CoQ, também chamada de ubiquinona, é o único componente da cadeia respiratória que não é ligado a proteínas. A CoQ é capaz de difundir-se através dos lipídios da membrana mitocondrial interna, devido ao alto grau hidrofóbico da sua cadeia lateral. Este movimento transmembrana faz parte do mecanismo de bombeamento de prótons da NADH desidrogenase e do complexo *b-c₁* (Marks *et al.*, 1996).

1.2.1.3 COMPLEXO II: SUCINATO: UBIQUINONA OXIRREDUTASE

O complexo II, também conhecido como succinato: ubiquinona oxirredutase, é um tetrâmero composto por duas subunidades polipeptídicas catalíticas que correspondem à succinato desidrogenase solúvel (SDH) ou succinato: metassulfato de fenazina oxirredutase, e duas subunidades polipeptídicas ancoradas na membrana mitocondrial interna. A succinato desidrogenase ocupa uma posição única como parte integrante do ciclo do ácido cítrico e também da cadeia respiratória (Oyedotum & Lemire, 1999). Ligado a SDH, o FAD recebe 2 elétrons e é reduzido a FADH₂. Este transfere seus elétrons para os centros Fe-S da enzima que então doa esses elétrons para a CoQ, para que estes fluam pela cadeia respiratória. Esse complexo, diferentemente dos outros (complexos I, III e IV), não funciona como bomba de prótons, não gerando gradiente eletroquímico (Marks *et al.*, 1996).

1.2.1.4 COMPLEXO III: COMPLEXO $b-c_1$ E CITOCROMO c

Os citocromos são proteínas que contêm um grupamento heme (um átomo de ferro ligado a um núcleo porfirina formado por 4 anéis pirrólicos). Os elétrons fluem entre os citocromos no sentido do citocromo de menor potencial redox para o de maior. Os átomos de ferro nos citocromos se encontram no estado Fe^{+3} . Quando este recebe um elétron é reduzido para Fe^{+2} , e, ao passar este elétron para o próximo componente da cadeia respiratória, é reoxidado a Fe^{+3} .

Os citocromos b e c_1 , juntamente com outras proteínas, formam o complexo de membrana $b-c_1$. O citocromo c é uma pequena proteína localizada na face externa da membrana mitocondrial interna, e, assim como a CoQ, é um transportador móvel de elétrons que transfere os elétrons do complexo $b-c_1$ para a citocromo oxidase (Marks *et al.*, 1996).

1.2.1.5 COMPLEXO IV: CITOCROMO OXIDASE

A citocromo oxidase (COX), último complexo da cadeia respiratória, transfere elétrons do citocromo c para o O_2 . Este complexo contém os citocromos a e a_3 e um sítio de ligação ao O_2 . Cada molécula de O_2 precisa receber 4 elétrons para ser reduzida a duas moléculas de H_2O . Na COX, a presença de íons Cu^{+2} facilita a redução do O_2 . Como o K_m da COX para o O_2 é muito menor que o K_m da mioglobina e da hemoglobina, o O_2 dos eritrócitos é facilmente transferido para seus sítios de redução (Marks *et al.*, 1996).

1.2.2 BOMBEAMENTO DE PRÓTONS

O bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço entre as membranas interna e externa (espaço intermembranas) da mitocôndria ocorre simultaneamente com a transferência de elétrons do NADH para a CoQ (catalisado pelo complexo I) e da CoQ para o citocromo *c* (catalisado pelo complexo III). A cada ciclo, a CoQ recebe 2 prótons e 2 elétrons da matriz mitocondrial. Ela transfere os 2 prótons para o espaço intermembranas e doa um elétron de volta para outro componente do complexo III e o outro para o citocromo *c*. O citocromo *c* transfere então este elétron para a COX (complexo IV) que também bombeia prótons para fora da matriz, contribuindo para a formação do gradiente de prótons. O complexo II não atua diretamente como bomba de prótons e participa diretamente do ciclo de Krebs (Marks *et al.*, 1996).

1.2.2.1 TRANSFERÊNCIA SEQUENCIAL DE ELÉTRONS

O fluxo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons deve ser seqüencial a partir do NADH ou FADH₂ até o O₂ para que ocorra a geração de ATP. Na cadeia respiratória, cada complexo que atua como bomba de prótons está associado à formação de aproximadamente uma molécula de ATP. Portanto, o bloqueio em qualquer ponto da cadeia transportadora de elétrons prejudica a formação ATP, pois o bombeamento de prótons para o espaço intermembrana está associado ao movimento dos elétrons de um carreador para o seguinte, e impede a formação do potencial eletroquímico (Marks *et al.*, 1996).

Além do possível déficit na produção de ATP, algumas doenças genéticas e outros distúrbios que envolvam a cadeia respiratória acabam por aumentar os níveis de NADH, inibindo o ciclo do ácido cítrico e prejudicando a conversão de piruvato a acetil-CoA para entrar no ciclo. Nessas condições, piruvato é convertido a lactato, cujos níveis séricos encontram-se aumentados (Voet & Voet, 1990).

1.2.3 CREATINA QUINASE

A enzima creatina quinase (CK) (E.C. 2. 7. 3. 2) catalisa a reação reversível de transferência do grupamento γ -fosfato do ATP para o grupamento guanidino da creatina (Cr), formando fosfocreatina (PCr) e ADP (Figura 1.3). A CK está presente em grandes quantidades em tecidos que requerem altas e flutuantes demandas de energia, como o músculo esquelético, o músculo cardíaco e o cérebro (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000).

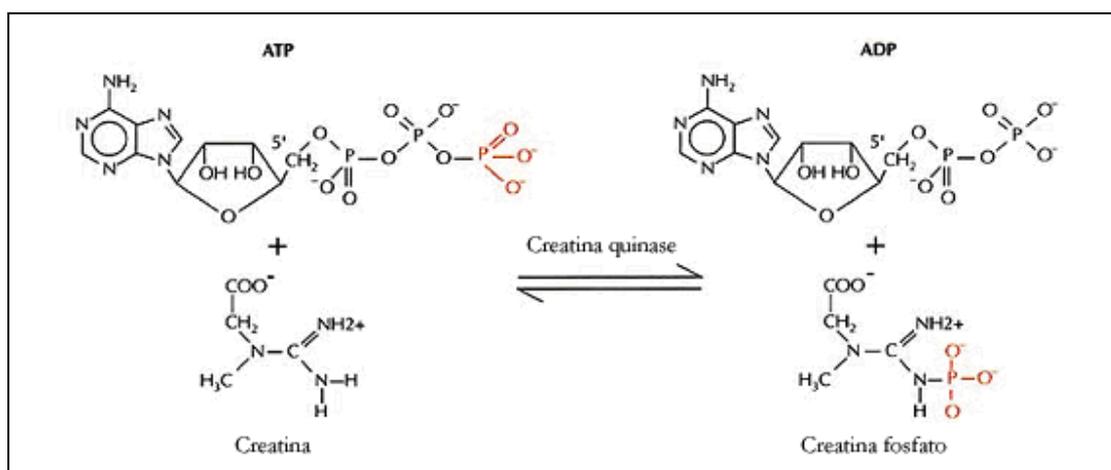


Figura 1.3. Reação catalisada pela creatina quinase (CK).

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

A Mi-CK interage simultaneamente com as membranas mitocondriais interna e externa, permanecendo acoplada à translocase de nucleotídeos de adenina, canal transportador do ATP da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. O grupamento γ -fosfato do ATP é transferido pela Mi-CK no espaço intermembranas para a Cr, formando ADP e PCr. A PCr deixa a mitocôndria e se difunde através do citoplasma até os sítios de consumo de energia, onde, por ação das isoenzimas citosólicas (CK-MM, CK-MB ou CK-BB), irá regenerar o ATP e formar novamente Cr. A Cr liberada pode retornar a mitocôndria fechando o ciclo (Figura 1.4) (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000). Foi também verificado que, em regiões cerebrais ricas em mitocôndrias, grandes quantidades de Mi-CK foram encontradas juntamente com CK-BB, o que poderia reforçar a hipótese desta associação (Kaldis *et al.*, 1996).

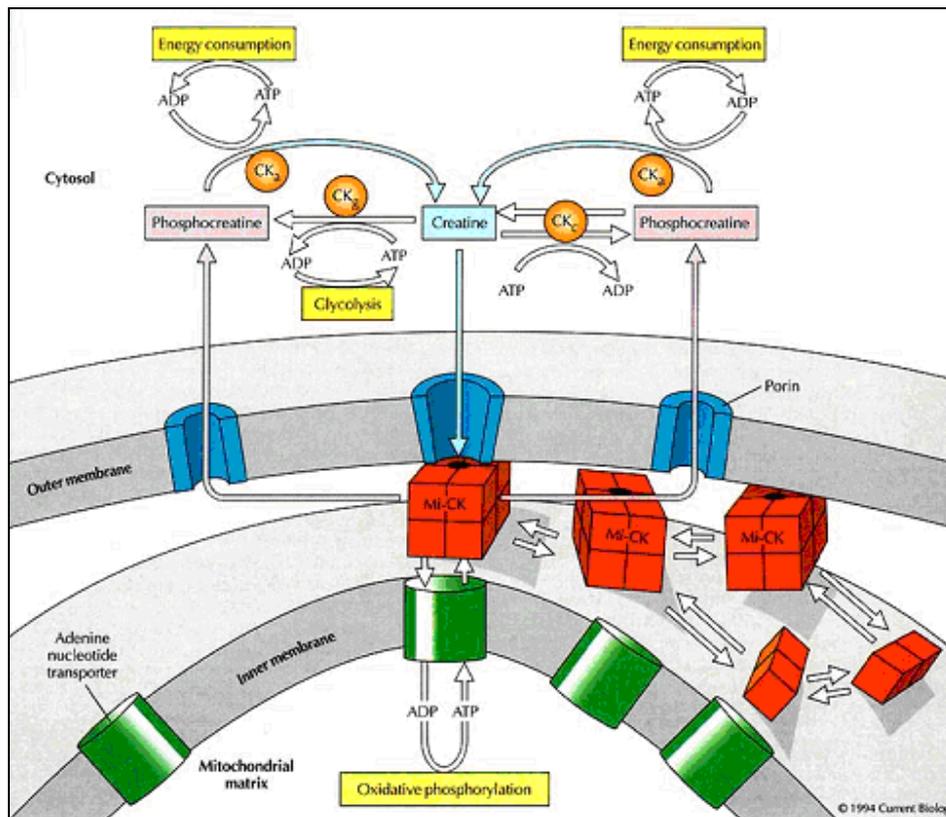


Figura 1.4. Função do sistema Cr/CK/PCr na difusão dos grupamentos fosfato e no tamponamento dos níveis de ATP junto aos sítios de consumo.

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

São relatadas, basicamente, duas funções para o sistema Cr/CK/PCr: a função de tamponamento energético e a função de transporte de grupamentos fosfato. Enquanto para o tamponamento energético uma alta atividade da Mi-CK não seria requerida, para a função de transporte sua atividade pode ser essencial, principalmente quando a difusão de nucleotídeos de adenina através da membrana mitocondrial externa for limitada. De acordo com esta idéia, a atividade

da Mi-CK está relacionada à capacidade oxidativa da musculatura estriada, sendo muito maior no tecido cardíaco (cerca de 35% da atividade total da CK) que em músculo esquelético (0,5 - 2% da atividade da CK total) (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000).

Recentemente, foi demonstrado que a Mi-CK é susceptível à inativação por peroxinitrito, produto que se acumula em diversas doenças neurodegenerativas. Esta inibição está relacionada à alteração de seus grupos tióis mediante a ação de agentes oxidantes (Stachowiak *et al.*, 1998). Além disso, a diminuição de atividade da CK-BB tem sido encontrada em pacientes com doenças como a doença de Alzheimer, em que o dano oxidativo parece estar relacionado à neurodegeneração (Aksenov *et al.*, 2000).

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

1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS

O estudo de doenças genéticas em seres humanos é extremamente difícil pela raridade das mesmas, e a criação de modelos animais experimentais que simulem a situação patológica envolvida no homem facilitou o entendimento das alterações bioquímicas observadas em vários EIM.

Segundo Herchkowitz (1982), nenhum modelo animal pode mimetizar completamente uma doença humana, mas pode ajudar no entendimento de vários aspectos da mesma. A grande vantagem dos modelos animais seria o estudo de indivíduos com o mesmo *background* genético, além do que este estudo pode ser realizado durante todo período de desenvolvimento da doença, ou seja, desde os estágios iniciais, e não somente no estágio terminal, quando as alterações patológicas já estão instaladas. Deve-se enfatizar também que uma das principais vantagens da utilização de modelos experimentais é que eles permitem estudar isoladamente as diferentes variáveis que podem estar envolvidas com a etiopatologia do estudo.

1.3.1 MODELOS DE ACIDEMIA GLUTÁRICA TIPO I

Um modelo animal de acidemia glutárica tipo I, através da deleção do gene *Gcdh* em células tronco embrionárias de camundongos foi recentemente desenvolvido (Koeller *et al.*, 2002). Estes animais possuem um fenótipo bioquímico muito similar aos pacientes humanos com AG I, incluindo elevações das concentrações de AG e 3-OHAG. Apesar de apresentarem um leve déficit motor, estes camundongos não desenvolvem uma distonia progressiva, como vista em pacientes humanos. Patologicamente, apresentam uma mielinopatia espongiiforme, porém não demonstram nenhuma evidência de perda de neurônios ou astrogliose no estriado, que são características da doença em humanos. Quando submetidos a um estresse metabólico, que em humanos precipitam as

crises encefálicas e o desenvolvimento de distonia, não apresentaram nenhum efeito neurológico nos camundongos.

Um interessante modelo animal espontâneo de deficiência de GCDH (variante genética) ocorre em uma espécie de morcegos egípcios *Rousettus aegypticus* que apresentam um fenótipo bioquímico similar ao dos pacientes com AG I, excretando níveis elevados de AG e 3-OHAG em sua urina. Estes morcegos perdem a atividade da GCDH no fígado e rim, mas mantêm a atividade enzimática em cérebro e medula espinhal comparável à de ratos normais. No entanto, os morcegos não desenvolvem sintomas declarados de degeneração estriatal, o que tem sido atribuído à atividade residual da GCDH em seu sistema nervoso central (Koeller *et al.*, 2004).

Por outro lado, foi sugerido um modelo de necrose estriatal aguda através da intoxicação sistêmica com ácido 3-nitropropiónico (3-NPA), pois segundo os autores, ela mimetiza mais corretamente as crises encefálicas de crianças com AG I (Strauss & Morton, 2003). O 3NPA inibe irreversivelmente a atividade do complexo II da cadeia respiratória causando a degeneração estriatal, deixando os pacientes com distonia severa (Ludolph *et al.*, 1991).

No entanto, apesar das contribuições que estes modelos animais de AG I têm trazido ao estudo da fisiopatogenia desta doença, é importante salientar que nenhum modelo mimetiza corretamente a condição humana.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Tendo em vista que pacientes afetados pela acidemia glutárica tipo I (AG I) apresentam dano cerebral predominante no estriado, o objetivo geral deste estudo foi investigar a influência *in vivo* e *in vitro* do ácido glutárico (AG), principal metabólito acumulado na AG I, sobre parâmetros do metabolismo energético celular no cérebro médio, músculo esquelético e músculo cardíaco de ratos jovens, na expectativa de se identificar possíveis alterações que possam explicar a neuropatologia dos pacientes afetados por esta doença.

2.2 ESPECÍFICOS

- Desenvolver um modelo animal experimental de acidemia glutárica através da administração subcutânea do ácido glutárico em ratos durante o seu desenvolvimento;
- Verificar os efeitos da administração *in vivo* e da adição *in vitro* do AG sobre a produção de CO₂ em cérebro médio de ratos de 21 dias;
- Verificar os efeitos da administração *in vivo* e da adição *in vitro* do AG sobre as atividades dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória em cérebro médio de ratos de 21 dias;

- Verificar os efeitos da administração *in vivo* do AG sobre as atividades dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória em músculo esquelético de ratos de 21 dias;
- Verificar os efeitos da administração *in vivo* do AG sobre as atividades dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória em músculo cardíaco de ratos de 21 dias;
- Verificar os efeitos da administração *in vivo* e da adição *in vitro* do AG sobre a atividade da enzima creatina quinase no cérebro médio de ratos de 21 dias;
- Verificar os efeitos da administração *in vivo* do AG sobre a atividade da enzima creatina quinase em músculo esquelético de ratos de 21 dias;
- Verificar os efeitos da administração *in vivo* do AG sobre a atividade da enzima creatina quinase em músculo cardíaco de ratos de 21 dias;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram de grau de pureza pró-análise (p.a.). O ácido glutárico (AG) foi sempre dissolvido e diluído na solução tampão específica de cada técnica no dia da realização dos ensaios.

3.1.1 REAGENTES UTILIZADOS

- α -Naftol – Sigma
- Acetato de etila - Merck
- [1-¹⁴C] ácido acético - Amersham
- Ácido glutárico - Sigma
- Ácido acético - Merck
- Ácido clorídrico - Merck
- Ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) sal dissódico – Sigma
- Ácido margárico - Sigma
- Ácido p-hidroximercuribenzóico (pHMB) – Sigma
- Ácido sulfúrico - Merck
- Ácido tricloroacético - Merck
- Adenina-5'-difosfato (ADP) - Sigma
- Albumina bovina - Sigma

- Azida sódica - Sigma
- Bicarbonato de potássio - Reagen
- Borohidrato de sódio – Sigma
- BSTFA + 1% TMS (bis-Trimetilsililtrifluoroacetamida + Trimetilclorosilano) - Sigma
- Cianeto de potássio - Merck
- Citocromo *c* – Sigma
- Cloreto de amônio - Reagen
- Cloreto de magnésio hexahidratado - Sigma
- Cloreto de potássio - Merck
- Cloreto de sódio -Sigma
- Creatina - Sigma
- D-[U-¹⁴C] glicose - Amersham
- Diacetil - ICN
- Dicloroindofenol (DCIP) – Sigma
- Etanol absoluto - Merck
- Fosfato de potássio dibásico - Reagen
- Fosfato de potássio monobásico - Merck
- Fosfocreatina - Sigma
- Glicose - Sigma
- Heparina 5.000 U.I./mL – Cristália
- Hexadecano - Sigma
- Hiamina - Sigma

- Hidróxido de sódio - Vetec
- Lauril-maltosídeo - Sigma
- Metassulfato de fenazina (PMS) - Sigma
- Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (β -NADH) - Sigma
- POP e POPOP - Sigma
- Rotenona - Sigma
- Sacarose – Reagen
- Solução fisiológica NaCl 0,9% - Texon
- Sulfato de sódio anidro - Merck
- Succinato de sódio hexahidratado - Sigma
- Sulfato de magnésio heptahidratado - Reagen
- Tolueno - Merck
- Trisma base - Sigma

3.1.2 EQUIPAMENTOS E OUTROS MATERIAIS

- Agitador de tubos Thermolyne modelo Maxi Mix Plus
- Agitador magnético Fisaton modelo 1005
- Balança Acculab modelo V-200
- Balança analítica digital Sartorius Basic
- Balança digital Kern modelo 430-21
- Banho metabólico Dubnoff
- Banho-maria Biomatic modelo 1052

- Centrífuga Eppendorf modelo 5403
- Cromatógrafo gasoso Varian GC 3400
- Cromatógrafo gasoso Varian GC Star 3400 CX
- Contador de cintilação líquida Wallac modelo 1409
- Deionizador
- Destilador
- Espectrômetro de Massa Varian Saturn 2000
- Espectrofotômetro Hitachi modelo U-2001 com leitura cinética e controle de temperatura
- Evaporador seco – Reacti Therm - Pierce
- Freezer -20°C Prosdócimo modelo H5
- Freezer -70°C Scien Temp
- Guilhotina
- Homogenizador elétrico B. Braun Biotech International modelo Potter S
- Máquina de fazer gelo Everest
- Material cirúrgico: tesouras, bisturis e espátulas
- Micropipetas de volume regulável Gilson
- Potenciômetro modelo Tec-2 (Tecnal).
- Refrigerador Brastemp
- Seringas Hamilton 10 µL
- Tubos plásticos Eppendorffs

- Vidraria: provetas, pipetas graduadas, potter de vidro, balões volumétricos, pacas de Petri, pipetas Pasteur, tubos de ensaio, funis, béqueres, cubetas, vials, poços de vidro.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Para a determinação do modelo experimental, foram utilizados ratos Wistar de 7, 14 e 21 dias de vida. Para a determinação da produção de CO₂ e das atividades enzimáticas dos complexos da cadeia respiratória e da creatina quinase, foram utilizadas amostras de cérebro médio de ratos Wistar de 21 dias de idade de ambos os sexos. Os animais, fornecidos pelo Departamento de Bioquímica – ICBS – UFRGS, foram mantidos em temperatura constante (20 ± 1 °C), em intervalos de 12 horas de ciclo claro/escuro, alimentados com ração padrão (Supra ou Purina, São Leopoldo, RS) e livre acesso à água. Este trabalho faz parte de um projeto maior intitulado “*Estudo dos mecanismos de neurotoxicidade de ácidos orgânicos*” já aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (projeto e parecer 0351/2001) e a utilização dos animais seguiu um protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Ética acima mencionado e os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (Principles of Laboratory Animal Care, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 85-23, revisada em 1985).

3.3 ADMINISTRAÇÃO SUBCUTÂNEA E MEDIDA DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS E TECIDUAIS DO ÁCIDO GLUTÁRICO

O ácido glutárico foi administrado subcutaneamente em quantidade necessária para atingir níveis cerebrais de aproximadamente 0,5 $\mu\text{mol/g}$ de cérebro ($\sim 0,5$ mM). Nossa experiência anterior com produção de modelos *in vivo* de acidemias orgânicas utilizou doses que variaram de 0,5 a 12 $\mu\text{mol/g}$ de peso do animal. Essas foram as doses testadas para a obtenção dos níveis cerebrais desejados. A determinação das concentrações do ácido glutárico foi feita por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama e cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas. Ratos Wistar de 7, 14 e 21 dias de idade foram sacrificados 15, 30, 60, 120 e 240 minutos após a injeção, o sangue foi coletado por punção cardíaca e o cérebro (cérebro total após o descarte dos bulbos olfatórios, cerebelo e tronco cerebral), músculo cardíaco e músculo esquelético isolados e homogeneizados com solução salina (NaCl 0,85%). Os parâmetros farmacocinéticos (volume de distribuição, depuração plasmática e meia-vida plasmática) foram calculados por programa de computador apropriado desenvolvido em nosso laboratório.

Após a obtenção dos níveis plasmáticos e cerebrais desejados do ácido glutárico, o mesmo foi administrado agudamente a animais de 21 dias, nos quais os parâmetros bioquímicos do metabolismo energético foram determinados em cérebro médio. Foi usada uma solução de ácido glutárico em solução salina tamponada, pH 7,4, que se administrou subcutaneamente na região dorso-lombar

na dose de 5 μmol por g de peso do animal. Os animais controles receberam solução salina nos mesmos volumes.

3.3.1 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE, CÉREBRO, MÚSCULO ESQUELÉTICO E MÚSCULO CARDÍACO

Os animais foram anestesiados com éter por alguns segundos. Após a injeção de ácido glutárico, amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca em seringas previamente heparinizadas após 15, 30, 60, 120 ou 240 minutos. As amostras de sangue foram então centrifugadas a 100 x g por 10 minutos para a separação do plasma, e este imediatamente congelado a -20°C .

Após a coleta de sangue, os animais foram sacrificados por decapitação e imediatamente tiveram seus cérebros removidos; o tecido cerebral, músculo cardíaco e músculo esquelético foram dissecados, pesados e homogeneizados em, respectivamente, 1:3, 1:5 e 1:7 (p/v) de NaCl 0,9 g%. Os homogeneizados foram centrifugados a 500 x g por 15 minutos; os sobrenadantes foram vertidos para tubos Eppendorf e congelados a -20°C .

As amostras foram submetidas posteriormente a análise quantitativa de ácido glutárico através de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.

3.3.2 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO GLUTÁRICO

As concentrações de ácido glutárico nas amostras de plasma e nos homogeneizados do tecido cerebral, músculo esquelético e músculo cardíaco de

ratos foram medidas pelo método de Sweetmann (1995) modificado em cromatógrafo gasoso ou cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa.

O método usa um injetor tipo spy ou split/splitless e uma coluna cromatográfica capilar (DB-5 metilpolisiloxano) (J & W Scientific) com detector de ionização de chama (DIC) (CG, Varian CG 3400) ou com detecção por espectrometria de massa (CG/EM, Varian Saturn 2000).

Preparação das amostras:

A um volume de 250 μL de plasma ou homogeneizado de tecido adicionaram-se 100 μL dos padrões internos hexadecano (3,8 mM) e ácido margárico (ácido heptadecanóico) (2,7 mM). Acidificou-se essa mistura até o pH 1 com ácido sulfúrico 2 N. Adicionou-se então 250 μL de cloreto de amônio saturado e, imediatamente após, extraiu-se duas vezes com 3,5 mL de acetato de etila com agitação por 8 minutos em vórtex. Após centrifugação a 400 x g por 10 minutos, os sobrenadantes das duas extrações foram reunidos e evaporados com nitrogênio a 60°C. Foram adicionados 200 μL de etanol aos frascos para dissolução do material e agitou-se por 1 minuto em vórtex. Após centrifugação, o líquido resultante foi transferido para vials de vidro. Após nova evaporação (N_2 a 60°C), as amostras foram derivatizadas com 27,5 μL de BSTFA (bis-Trimetilsililtrifluoroacetamida) + 1% TMS (Trimetilclorosilano). A mistura foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto, e, após centrifugação (400 x g por 10 minutos), incubou-se por 1 hora a 60°C com os vials envoltos em papel alumínio.

Uma alíquota de 1 μ L foi utilizada para a injeção nos cromatógrafos (CG/DIC e CG/EM).

Condições da cromatografia gasosa:

- Temperatura inicial da coluna: 90°C
- Temperatura final da coluna: 280°C
- Temperatura do injetor: 250°C
- Velocidade do fluxo de gás hélio: 27 mL/min.

Condições do espectrômetro de massa:

- Temperatura da fonte de íons: 280°C
- Temperatura do analisador de massa: 280°C

A análise cromatográfica demorou 78,33 minutos e a temperatura da coluna aumentou gradativamente até atingir 280°C.

Uma curva padrão com o ácido glutárico foi feita no mesmo dia das determinações do ácido glutárico no sangue e tecido cerebral e comparada aos picos cromatográficos verificados nesses tecidos para possibilitar o cálculo final da concentração de ácido glutárico nas amostras. Utilizou-se padronização interna para fins de análise quali e quantitativa, sendo o ácido margárico o padrão interno utilizado.

3.4 TRATAMENTO AGUDO COM ÁCIDO GLUTÁRICO PARA A DETERMINAÇÃO DOS DIFERENTES PARÂMETROS DO METABOLISMO ENERGÉTICO

Ratos de 21 dias foram submetidos a 3 administrações subcutâneas do ácido com intervalos de 90 minutos entre as injeções. O volume máximo de cada injeção foi de 5 $\mu\text{L/g}$ de peso do animal. A primeira dose foi de 5 μmol de AG/g de peso do animal, e as seguintes foram equivalentes a 75% desta dose (3,75 $\mu\text{mol/g}$). Uma hora após a última injeção, os animais foram sacrificados e os tecidos isolados para cada técnica. As concentrações atingidas pelo AG quando os animais foram sacrificados foram as mesmas de quando se fez uso de injeção única do ácido.

3.5 PRODUÇÃO DE CO_2 POR HOMOGENEIZADOS DE CÉREBRO MÉDIO DE RATOS JOVENS

A produção de CO_2 por homogeneizados de cérebro médio foi determinada a partir de D-[U- ^{14}C] glicose (0,055 μCi) na presença de 5 mM de D-glicose no meio de incubação ou de [1- ^{14}C] ácido acético (0,055 μCi) na presença de 1 mM de ácido acético. Para os experimentos *in vitro*, os tubos testes continham 0,2, 1 ou 5 mM de AG. Os tubos controles não continham o AG. Nos experimentos *in vivo*, os animais foram injetados com AG dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%, grupo experimental) ou com solução salina (grupo controle).

3.5.1 PREPARAÇÃO DOS TECIDOS

Os animais foram sacrificados por decapitação, o cérebro médio, contendo o estriado, foi isolado e homogeneizado na proporção de 1:10 (p/v) em solução tampão contendo KHCO_3 30 mM, KH_2PO_4 30 mM, NaCl 30 mM, MgCl_2 3,5 mM, EDTA 0,2 mM e sacarose 24 mM, pH 7,4, previamente aerada com mistura carbogênica durante 10 minutos.

3.5.2 PRODUÇÃO DE CO_2

Um volume de 450 μL de homogeneizado, contendo aproximadamente 45 mg de cérebro médio, foi pré-incubado por 20 minutos a 35°C em banho metabólico com agitação (os testes *in vitro* foram realizados na presença de 1,4 mM de lauril-maltosídeo). Após, foram acrescentados ao meio de incubação os substratos marcados e os ácidos a serem testados (tubos testes *in vitro*). Os frascos foram fechados com tampas de borracha contendo caçapas de vidro com papel filtro dobrado em forma de “W”, vedados com parafilme e devolvidos ao banho. Transcorrida 1 hora de incubação a reação foi interrompida pela adição de 200 μL de TCA 50% ao homogeneizado e foram adicionados então 100 μL de hiamina dentro das caçapas. Os frascos foram devolvidos ao banho por 30 minutos para que o CO_2 pudesse ser incorporado ao papel filtro impregnado por hiamina. Terminado este procedimento, o papel filtro embebido em hiamina foi retirado com o auxílio de uma pinça e de uma micropipeta sendo transferido para

tubos de plástico. Em cada tubo foi adicionado 3 mL de líquido de cintilação POP/POPOP/tolueno (4g/ 50 mg/ tolueno q.s.p 1000 mL) quando da adição do papel filtro e da hiamina nos tubos. Posteriormente, os tubos foram agitados e a radioatividade incorporada ao CO₂ foi determinada em contador de cintilação líquida. Os resultados foram expressos em pmol de glicose ou pmol de acetato convertidos a CO₂ / mg de tecido/ h de incubação.

3.6 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS COMPLEXOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA EM HOMOGENEIZADOS DE CÉREBRO MÉDIO, MÚSCULO ESQUELÉTICO E MÚSCULO CARDÍACO DE RATOS JOVENS

Para os experimentos *in vitro*, as atividades dos complexos da cadeia respiratória foram determinadas na presença de 0,2, 1 ou 5 mM de AG (tubos testes) ou na ausência do ácido (tubos controles). Para os experimentos *in vivo*, foram utilizados ratos tratados com AG (grupo teste) ou com NaCl 0,9% (grupo controle). O AG foi sempre dissolvido e diluído na solução tampão utilizada para cada técnica. Os experimentos foram sempre realizados em duplicata.

3.6.1 PREPARAÇÃO DO TECIDO

Ratos Wistar de 21 dias de idade foram sacrificados por decapitação, o cérebro foi rapidamente removido e o cérebro médio (que consiste no encéfalo, após retirada do cerebelo, bulbos olfatórios, ponte, medula e córtex cerebral),

músculo esquelético e músculo cardíaco foram isolados e homogeneizados 1:20 (p/v) em tampão SETH (sacarose 250 mM, EDTA 2 mM, Trisma base 10 mM e heparina dissolvidos em água destilada e deionizada q.s.p 50 mL) pH 7,4. Os homogeneizados foram centrifugados a 800 x g por 10 minutos e os sobrenadantes separados em alíquotas de 200 a 300 µL e mantidos a -70°C por um período máximo de um mês até o momento das determinações enzimáticas.

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

3.6.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO I-III (NADH: CITOCROMO C OXIRREDUTASE)

Ao meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 20 mM pH 8, KCN 2 mM, EDTA 10 µM, citocromo c 50 µM, foram adicionados 10 a 25 µg de proteínas do homogeneizado e 25 µM de NADH iniciando a reação. A redução do citocromo c foi registrada a 550 nm e 25° C. Após, foram adicionados 10 µM de rotenona e as absorbâncias continuaram sendo registradas por mais 3 minutos. A diferença entre os dois momentos de leitura correspondeu à atividade da NADH: citocromo c oxirredutase sensível à rotenona (Schapira *et al.*, 1990). A atividade foi expressa em nmol de citocromo c reduzido / min / mg de proteína.

3.6.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO II (SUCINATO: DCIP OXIRREDUTASE) E SUCINATO DESIDROGENASE (SDH)

Ao meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio (K_2HPO_4/KH_2PO_4) 62,5 mM pH 7,4, tampão SETH pH 7,4, succinato de sódio 1 mM, dicloroindofenol (DCIP) 9 μ M, foi adicionada amostra contendo cerca de 80 a 140 μ g de proteína. Os sistemas foram pré-incubados por 20 minutos a 30°C em banho-maria e, após, foram adicionados azida sódica 4,3 mM, rotenona 7 μ M e DCIP 42 μ M.

A redução do DCIP foi determinada em 600 nm a 25°C durante 5 minutos para a medida da atividade global do complexo II. Transcorridos os primeiros 5 minutos, foi adicionado metassulfato de fenazina (PMS) 1mM para a determinação da atividade da SDH, também pela redução do DCIP, por mais 5 minutos (Fischer *et al.*, 1985). Ambas as atividades foram expressas em nmol de DCIP reduzido / min / mg de proteína.

3.6.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO II-III (SUCINATO: CITOCROMO C OXIRREDUTASE)

Ao meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 40 mM pH 7,4 e succinato de sódio 16 mM, foi adicionada amostra contendo 40 a 80 μ g de proteína. Os sistemas foram pré-incubados por 30 minutos a 37°C e, após, foram adicionados 4 mM de azida sódica e 7 μ M de rotenona e a reação foi iniciada pela adição de 0,6 μ g/mL de citocromo c. A redução do citocromo c foi registrada em

550 nm de a 25°C durante 5 minutos (Fischer *et al.*,1985). A atividade foi expressa em nmol de citocromo *c* reduzido / min / mg de proteína.

3.6.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO IV (CITOCROMO C OXIDASE)

A oxidação do citocromo *c*, previamente reduzido com borohidrato de sódio, foi registrada a 25°C em 550 nm durante 10 min. O meio de incubação continha tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7, lauril-maltosídeo 0,6 mM e amostra com 2 a 4 µg de proteína. A reação foi iniciada com a adição de 0,7 µg de citocromo *c* reduzido (Rustin *et al.*, 1994). A atividade foi expressa em nmol de citocromo *c* oxidado / min / mg de proteína.

3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CREATINA QUINASE EM HOMOGENEIZADOS DE CÉREBRO MÉDIO, MÚSCULO ESQUELÉTICO E MÚSCULO CARDÍACO DE RATOS JOVENS DE RATOS JOVENS

Para os experimentos *in vitro* em cérebro médio, a atividade total da creatina quinase (CK total) foi determinada na presença de 0,2 ,1 e 5 mM de AG (tubos testes) e na ausência do ácido (tubos controles). Para os experimentos *in vivo*, foram utilizados ratos tratados com AG (grupo teste) e com NaCl 0,9% (grupo controle). O ácido foi dissolvido e diluído na solução tampão da técnica e os experimentos realizados em triplicata.

3.7.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Ratos Wistar de 21 dias de vida foram sacrificados por decapitação, o cérebro foi removido sobre placa de Petri em gelo, e o cérebro médio foi rapidamente isolado. Posteriormente, o tecido foi homogeneizado na proporção de 1:10 (p/v) em solução salina 0,85% tamponada, pH 7,5. A homogeneização foi feita manualmente utilizando homogeneizador de vidro em gelo. O homogeneizado foi armazenado em alíquotas de 10 μ L a -70°C por, no máximo uma semana, até o momento da medição da atividade total da enzima (CK total).

3.7.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade da CK foi medida em homogeneizado de cérebro médio (CK total). A mistura reacional continha tampão Tris-HCl 60 mM, pH 7,5, fosfocreatina 7 mM, MgSO_4 9 mM, lauril-maltosídeo 0,625 mM e aproximadamente 0,4-1,2 μ g de proteína em um volume final de 100 μ L. Os sistemas foram pré-incubados por um período de 15 minutos a 37°C , sendo a reação iniciada com a adição de ADP e glutatona reduzida a uma concentração final de 3,2 mM e 0,8 mM, respectivamente. A reação foi interrompida após 10 minutos de incubação com a adição de 20 μ L de ácido p-hidroximercuribenzóico (pHMB) 50 mM. A creatina formada foi estimada através de método colorimétrico, e a coloração foi obtida pela adição de 100 μ L de α -naftol 20%, 680 μ L de água deionizada e 100 μ L de diacetil 20%. A leitura foi feita após uma segunda incubação de 20 minutos a 37°C

por espectrofotometria a 540 nm (Hughes *et al.*, 1962). O resultado final foi expresso em μmol de creatina formada / min / mg de proteína.

3.8 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA

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

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados usando o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 11.0 em um computador PC compatível. Para os experimentos *in vitro*, utilizou-se análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de múltipla amplitude de Duncan, quando o valor de F foi significativo. Para os experimentos *in vivo*, utilizou-se o teste *t* de Student para amostras independentes. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

4.1 INDUÇÃO DE ACIDEMIA GLUTÁRICA: DESENVOLVIMENTO DO MODELO EXPERIMENTAL

Procuramos no presente trabalho induzir níveis cerebrais de aproximadamente 0,5 μmol de ácido glutárico por grama de tecido ($\sim 0,5\text{mM}$) através da administração do ácido a ratos Wistar de 7, 14 e 21 dias por via subcutânea, valor encontrado em estudos *postmortem* realizados em cérebro de pacientes afetados pela AG I.

4.1.1 DETERMINAÇÃO DA DOSE DO ÁCIDO GLUTÁRICO

O primeiro passo do trabalho foi estabelecer as doses subcutâneas de AG a serem administradas aos animais que levassem a atingir níveis cerebrais deste ácido similares aos encontrados nos pacientes afetados por AG I.

Nesse particular, o cálculo das doses foi feito tomando-se em consideração a experiência na produção de outros modelos animais por nosso grupo de pesquisa, especialmente o de acidemia metilmalônica (Dutra *et al.*, 1991) e o de acidemia propiônica (Brusque *et al.*, 1997). Assim, a dose de ácido glutárico que ficou estabelecida que resultou em níveis cerebrais em torno de 0,5 $\mu\text{mol/g}$ foi de 5 μmol de ácido glutárico por g de peso corporal.

Antes da injeção do ácido, apenas traços do AG podiam ser encontrados nos tecidos, pois apesar do pico referente ao composto possuir um espectro de

massas compatível com o AG, ele encontrava-se abaixo da linha de base, impossibilitando sua quantificação.

4.1.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE SEUS NÍVEIS PLASMÁTICOS

Injeções de AG dissolvido em solução salina tamponada (pH 7,4) foram administradas subcutaneamente em ratos Wistar de 7, 14 e 21 dias em uma dose de 5 μmol do ácido por g de peso corporal do animal. Podemos observar na tabela 4.1 os níveis plasmáticos de ácido glutárico quantificados em intervalos de 15, 30, 60, 120 e 240 minutos após a injeção.

Tabela 4.1. Níveis plasmáticos do AG em ratos Wistar de 7, 14 e 21 dias

Idade (dias)	Tempo após a injeção do ácido glutárico (min)				
	15	30	60	120	240
7	6,39 \pm 0,23 (3)	6,45 \pm 0,30 (4)	6,20 \pm 0,60 (4)	3,67 \pm 0,65 ^b (3)	0,77 \pm 0,10 ^b (3)
14	6,32 \pm 0,95 (3)	6,28 \pm 0,44 (4)	5,21 \pm 0,48 (4)	2,51 \pm 0,20 ^b (2)	0,39 \pm 0,22 ^b (3)
21	6,29 \pm 2,01 (3)	4,83 \pm 0,27 ^a (4)	3,69 \pm 0,23 ^a (4)	1,79 \pm 0,41 ^c (3)	0,19 \pm 0,08 ^d (2)

Os valores acima representam a média, expressa em mmol.L^{-1} \pm erro padrão encontrados no plasma e o valor entre parênteses corresponde ao número de animais testados. ^a diferente das outras idades no mesmo tempo; ^b diferente dos outros tempos na mesma idade; ^c diferente de 15 minutos na mesma idade; ^d diferente de 15, 30 e 60 minutos na mesma idade (ANOVA seguida do teste de Duncan, $p < 0,05$).

Verifica-se que, à medida que a idade dos animais avança, a concentração de AG no plasma diminui mais rapidamente.

A tabela 4.2 apresenta os parâmetros farmacocinéticos do AG calculados a partir dos níveis plasmáticos obtidos nos diferentes tempos após a injeção do ácido em ratos Wistar de 7, 14 e 21 dias de idade.

Tabela 4.2. Determinação dos parâmetros farmacocinéticos do ácido glutárico em ratos de 7, 14 e 21 dias de idade

Idade (dias)	D ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	$t_{1/2}$ (min)	CLp ($\text{mL.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$)	Vd (L.kg^{-1})
7	5	58,8	5,20	0,44
14	5	47,4	6,70	0,46
21	5	41,0	9,05	0,54

D= dose ; $t_{1/2}$ = tempo de meia-vida plasmática; CLp = depuração plasmática; Vd= *volume aparente de distribuição*

Observamos na tabela que, à medida que a idade dos animais avança, o tempo de vida médio do ácido glutárico no plasma diminui, enquanto a depuração plasmática e o volume de distribuição aumentam. Isso possivelmente se deve à maturação renal nos animais de mais idade, bem como a maturação enzimática dos vários tecidos necessária à metabolização do ácido, enquanto que, nos ratos de 7 dias de vida, estes sistemas estão pouco desenvolvidos.

4.1.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDO GLUTÁRICO SOBRE SEUS NÍVEIS CEREBRAIS

A tabela 4.3 mostra os níveis cerebrais de ácido glutárico nos ratos nos diferentes tempos após a administração do ácido. Podemos observar uma diferença no comportamento da droga no cérebro em relação ao plasma, pois enquanto o pico da concentração plasmática ocorre já aos 15 minutos, nota-se que há uma tendência de os níveis cerebrais de AG alcançarem um pico por volta de 30 - 60 minutos, indicando a seletividade da barreira hemato-encefálica a este composto. Além disso, os ratos de 21 dias de idade apresentaram uma menor concentração do fármaco.

Tabela 4.3. Níveis cerebrais de AG em ratos Wistar de 7, 14 e 21 dias

Idade (dias)	Tempo após a injeção do ácido glutárico (min)				
	15	30	60	120	240
7	0,14 ± 0,01 ^{a,e} (4)	0,39 ± 0,02 (4)	0,63 ± 0,05 ^{c,d} (4)	0,37 ± 0,06 (4)	0,17 ± 0,03 ^{a,e} (4)
14	0,17 ± 0,01 ^e (4)	0,47 ± 0,07 (3)	0,43 ± 0,03 (3)	0,32 ± 0,04 (2)	0,11 ± 0,02 ^e (2)
21	0,23 ± 0,04 (3)	0,27 ± 0,04 ^b (4)	0,31 ± 0,01 (4)	0,22 ± 0,01 (3)	0,07 ± 0,01 ^d (4)

Os valores acima representam a média, expressa em $\mu\text{mol.g}^{-1}$ (~mM) \pm erro padrão, encontrados no cérebro e o valor entre parênteses corresponde ao número de animais testados. ^a diferente de 21 dias no mesmo tempo; ^b diferente de 14 dias no mesmo tempo; ^c diferente de 14 e 21 dias no mesmo tempo; ^d diferente dos outros tempos na mesma idade; ^e diferente de 30, 60 e 120 minutos na mesma idade (ANOVA seguida do teste de Duncan, $p < 0,05$).

4.1.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE SEUS NÍVEIS EM MÚSCULO CARDÍACO E ESQUELÉTICO

As tabelas 4.4 e 4.5 mostram os níveis de ácido glutárico nos ratos nos diversos tempos após a administração da droga em músculo cardíaco e esquelético, respectivamente. Comparando-se ao cérebro, observa-se que o AG atinge concentrações aproximadamente cinco vezes maiores nestes tecidos.

Tabela 4.4. Níveis de AG em músculo cardíaco de ratos Wistar de 7, 14 e 21 dias

Idade (dias)	Tempo após a injeção do ácido glutárico (min)		
	30	60	120
7	3,29 ± 0,13 (2)	2,52 ± 0,36 (4)	2,03 ± 0,21 ^b (4)
14	3,12 ± 0,14 ^c (4)	2,44 ± 0,16 ^c (4)	1,62 ± 0,20 (3)
21	1,93 ± 0,53 ^a (4)	1,64 ± 0,16 (2)	0,90 ± 0,35 ^{a,b} (4)

Os valores acima representam a média, expressa em $\mu\text{mol.g}^{-1}$ (~mM) \pm erro padrão encontrados no músculo cardíaco e o valor entre parênteses corresponde ao número de animais testados. ^a diferente de outras idades no mesmo tempo; ^b diferente de 30 minutos na mesma idade; ^c diferente dos outros tempos na mesma idade (ANOVA seguida do teste de Duncan, $p < 0,05$).

Tabela 4.5. Níveis de AG em músculo esquelético de ratos Wistar de 7, 14 e 21 dias

Idade (dias)	Tempo após a injeção do ácido glutárico (min)		
	30	60	120
7	4,33 ± 0,24 ^{a,b} (4)	3,92 ± 0,25 ^a (4)	3,20 ± 0,29 ^a (4)
14	2,31 ± 0,14 (4)	2,28 ± 0,31 (3)	1,43 ± 0,49 (2)
21	2,17 ± 0,23 ^b (4)	1,74 ± 0,19 (4)	1,30 ± 0,26 (4)

Os valores acima representam a média, expressa em $\mu\text{mol.g}^{-1}$ (~mM) \pm erro padrão encontrados no músculo esquelético e o valor entre parênteses corresponde ao número de animais testados. ^a diferente de outras idades no mesmo tempo; ^b diferente de 120 minutos na mesma idade (ANOVA seguida do teste de Duncan, $p < 0,05$).

Observamos nas tabelas 4.4. e 4.5 que as concentrações do ácido glutárico no músculo cardíaco e esquelético encontram-se em seus valores máximos 30 min após a injeção e são aproximadamente cinco vezes maior do que no cérebro, provavelmente indicando uma maior permeabilidade da membrana plasmática desses tecidos ao ácido, diferentemente do que ocorre no cérebro que, além da membrana plasmática, possui a seletiva barreira hemato-encefálica.

As tabelas 4.6, 4.7 e 4.8 mostram as relações entre as médias das concentrações do AG nos vários tecidos e no plasma em ratos de 7, 14 e 21 dias.

Tabela 4.6. Razões entre os níveis de AG encontradas nos vários tecidos e no plasma em ratos Wistar de 7 dias

Idade	Tempo após a injeção do ácido glutárico					
	7 dias	15 min	30 min	60 min	120 min	240 min
C/P	0,022	0,060	0,102	0,102	0,102	0,217
MC/P	-	0,510	0,406	0,553	0,553	-
ME/P	-	0,671	0,632	0,872	0,872	-

C = cérebro total; P = plasma; MC = músculo cardíaco; ME = músculo esquelético

Tabela 4.7. Razões entre os níveis de AG encontradas nos vários tecidos e no plasma em ratos Wistar de 14 dias

Idade	Tempo aos a injeção do ácido glutárico					
	14 dias	15 min	30 min	60 min	120 min	240 min
C/P	0,027	0,074	0,083	0,083	0,129	0,279
MC/P	-	0,497	0,468	0,468	0,645	-
ME/P	-	0,368	0,438	0,438	0,570	-

C = cérebro total; P = plasma; MC = músculo cardíaco; ME = músculo esquelético

Tabela 4.8. Razões entre os níveis de AG encontradas nos vários tecidos e no plasma em ratos Wistar de 21 dias

Idade	Tempo após a injeção do ácido glutárico					
	21 dias	15 min	30 min	60 min	120 min	240 min
C/P		0,036	0,047	0,084	0,123	0,373
MC/P		-	0,399	0,444	0,503	-
ME/P		-	0,449	0,471	0,726	-

C = cérebro total; P = plasma; MC = músculo cardíaco; ME = músculo esquelético

Os resultados demonstram que a relação dos níveis de AG nos diferentes tecidos estudados com o plasma aumenta com o tempo após a injeção do ácido, ou seja, que o ácido permanece mais tempo no cérebro, músculo cardíaco e músculo esquelético do que no plasma.

4.2 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO ÁCIDO GLUTÁRICO SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO METABOLISMO ENERGÉTICO

Investigou-se o efeito da administração do ácido glutárico sobre os parâmetros do metabolismo energético em cérebro médio, músculo esquelético e músculo cardíaco de ratos jovens.

4.2.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE A PRODUÇÃO DE CO₂ A PARTIR DE GLICOSE EM HOMOGENEIZADOS DE CÉREBRO MÉDIO DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE

A figura 4.1 mostra que a administração do AG não inibe significativamente a produção de CO₂ a partir de glicose [$t(8)=0,728$; $p > 0,05$].

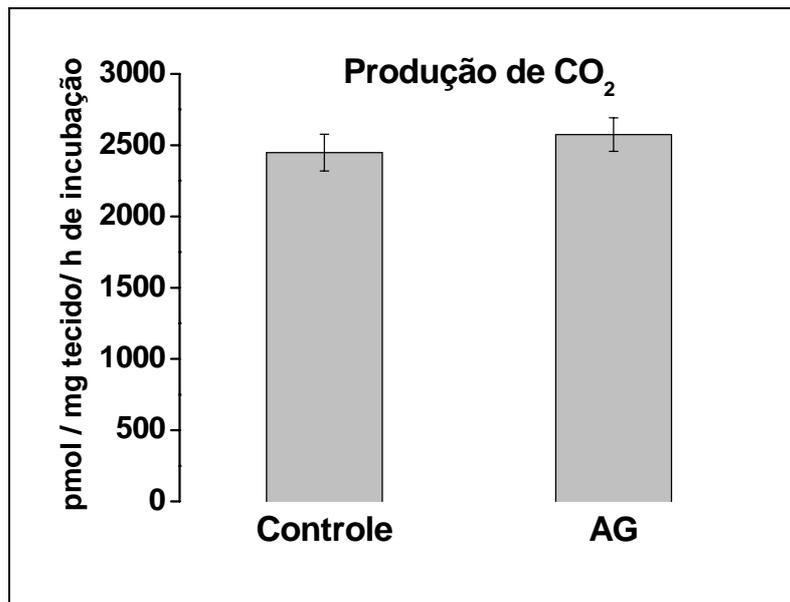


Figura 4.1. Efeito da administração do AG sobre a produção de CO₂ a partir de glicose em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em pmol de glicose convertida a CO₂ / mg de tecido / hora de incubação) ± erro padrão (n=5). A diferença entre as médias foi calculada pelo teste *t* de Student para amostras independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.2.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE A ATIVIDADE DOS COMPLEXOS ENZIMÁTICOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA EM HOMOGENEIZADOS DE CÉREBRO MÉDIO DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE

O efeito da administração de AG sobre as atividades dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens foi investigado. Verificamos que a administração do ácido inibiu significativamente a atividade do complexo I-III [$t(8) = 3,845$; $p < 0,01$] (figura 4.2) e não teve efeito significativo sobre as atividades dos complexos II [$t(8) = 0,238$; $p > 0,05$] (figura 4.3), II-III [$t(8) = 1,383$; $p > 0,05$] (figura 4.4), IV [$t(8) = 0,697$; $p > 0,05$] (figura 4.5) e da enzima succinato desidrogenase [$t(8) = 0,696$; $p > 0,05$] (figura 4.6).

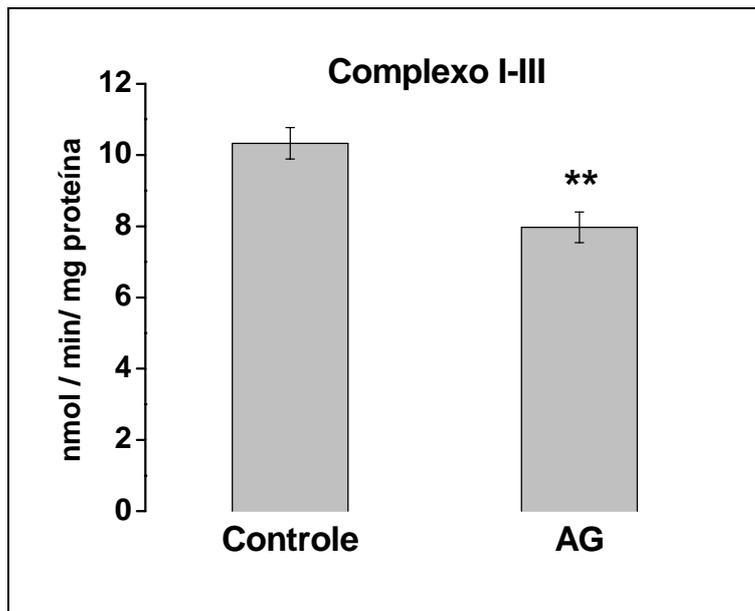


Figura 4.2. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em nmol de citocromo *c* reduzido / min / mg de proteína) \pm erro padrão (n=5). A diferença entre as médias foi calculada pelo teste *t* de Student para amostras independentes (**p <0,01, comparado ao controle).

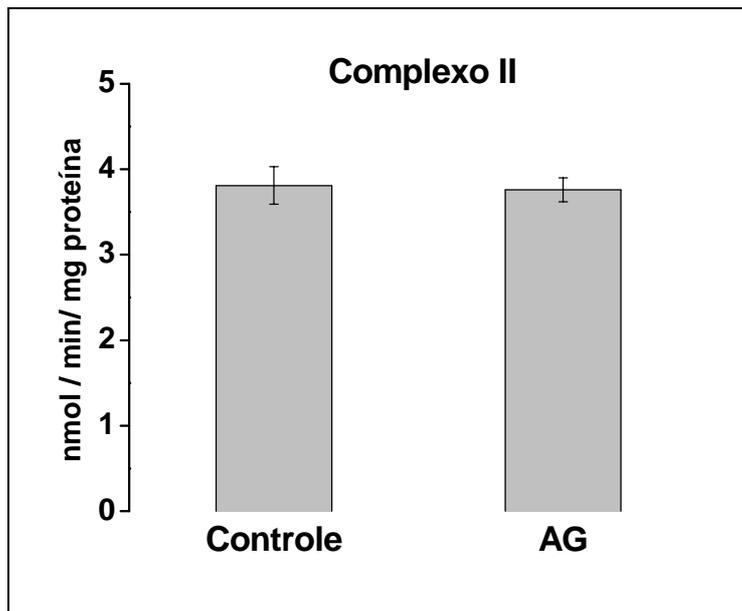


Figura 4.3. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em nmol de DCIP reduzido / min / mg de proteína) \pm erro padrão (n=5). A diferença entre as médias foi calculada pelo teste *t* de Student para amostras independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

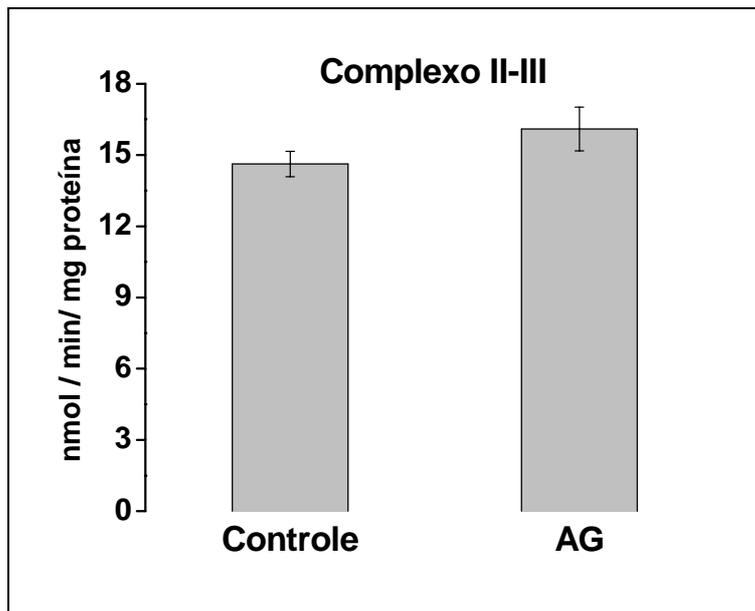


Figura 4.4. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em nmol de citocromo *c* reduzido / min / mg de proteína) \pm erro padrão (n=5). A diferença entre as médias foi calculada pelo teste *t* de Student para amostras independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

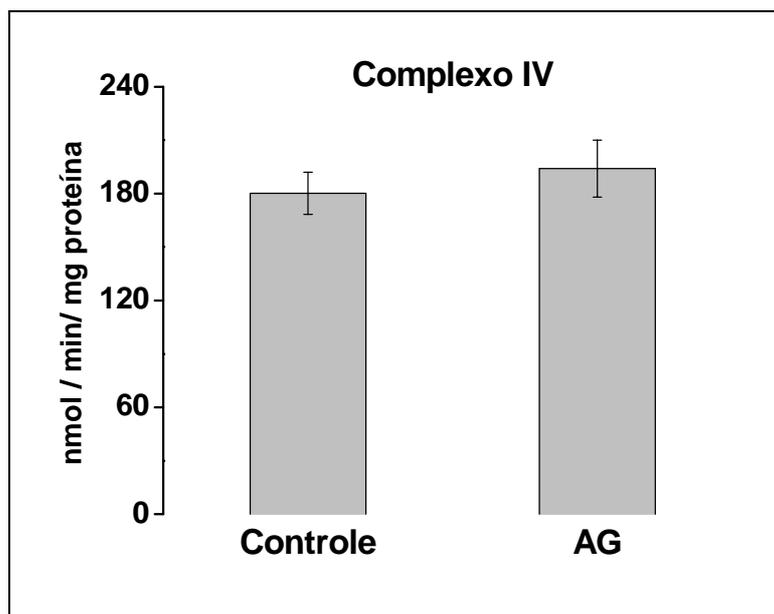


Figura 4.5. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em nmol de citocromo *c* oxidado / min / mg de proteína) \pm erro padrão (n=5). A diferença entre as médias foi calculada pelo teste *t* de Student para amostras independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

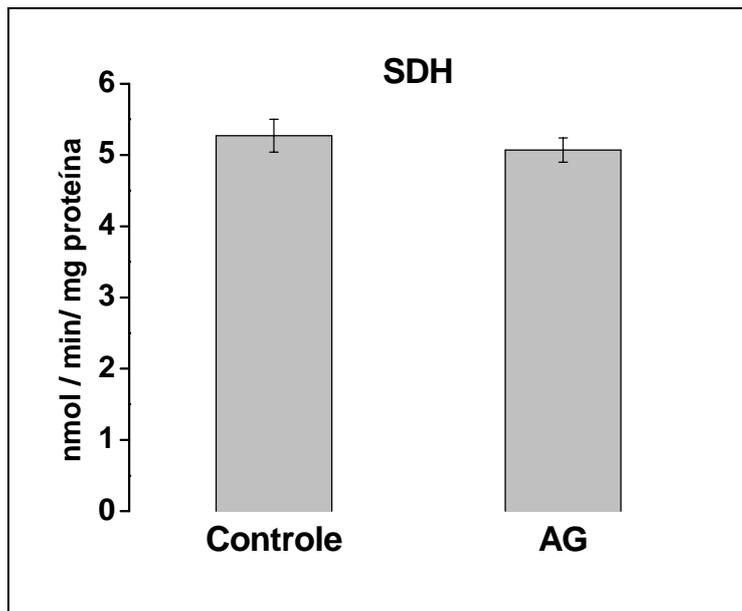


Figura 4.6. Efeito da administração do AG sobre a atividade da enzima SDH em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em nmol de DCIP reduzido / min / mg de proteína) \pm erro padrão (n=5). A diferença entre as médias foi calculada pelo teste *t* de Student para amostras independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.2.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE A ATIVIDADE DOS COMPLEXOS ENZIMÁTICOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA EM HOMOGENEIZADOS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE

O efeito da administração de AG sobre as atividades dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória em homogeneizados de músculo esquelético de ratos jovens foi avaliado. Verificamos que a administração do ácido inibiu significativamente a atividade dos complexos I-III [$t(8) = 2,429$; $p < 0,05$] (figura 4.7) e II-III [$t(8) = 2,636$; $p < 0,05$] (figura 4.9) e não teve efeito significativo sobre a atividade dos complexos II [$t(8) = 1,640$; $p > 0,05$] (figura 4.8), IV [$t(8) = 1,479$; $p > 0,05$] (figura 4.10) e sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase [$t(8) = 1,765$; $p > 0,05$] (figura 4.11). No entanto, podemos observar que o AG apresenta uma tendência de diminuição da atividade do complexo II e IV e da SDH, embora esta diferença não seja significativa.

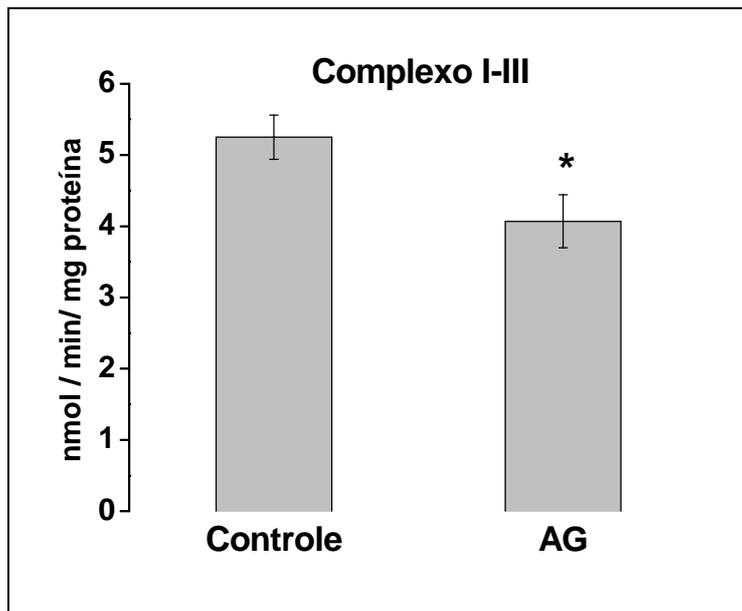


Figura 4.7. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória em homogeneizados de músculo esquelético de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em nmol de citocromo *c* reduzido / min / mg de proteína) \pm erro padrão (n=5). A diferença entre as médias foi calculada pelo teste *t* de Student para amostras independentes (**p* <0,05, comparado ao controle).

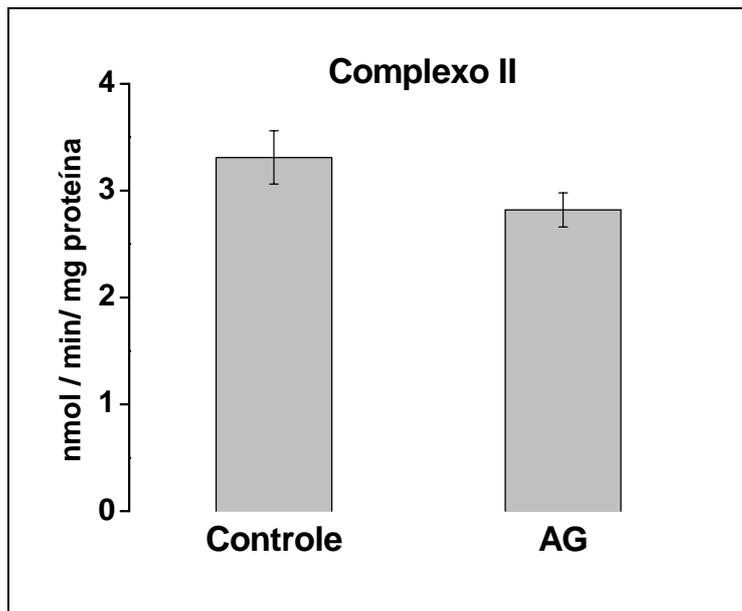


Figura 4.8. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de músculo esquelético de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em nmol de DCIP reduzido / min / mg de proteína) \pm erro padrão (n=5). A diferença entre as médias foi calculada pelo teste *t* de Student para amostras independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

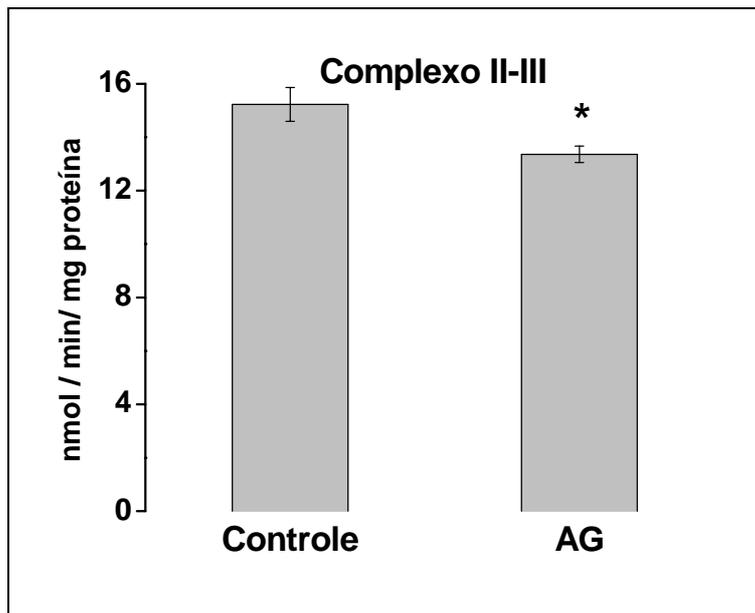


Figura 4.9. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória em homogeneizados de músculo esquelético de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em nmol de citocromo *c* reduzido / min / mg de proteína) \pm erro padrão (n=5). A diferença entre as médias foi calculada pelo teste *t* de Student para amostras independentes (**p* <0,05, comparado ao controle).

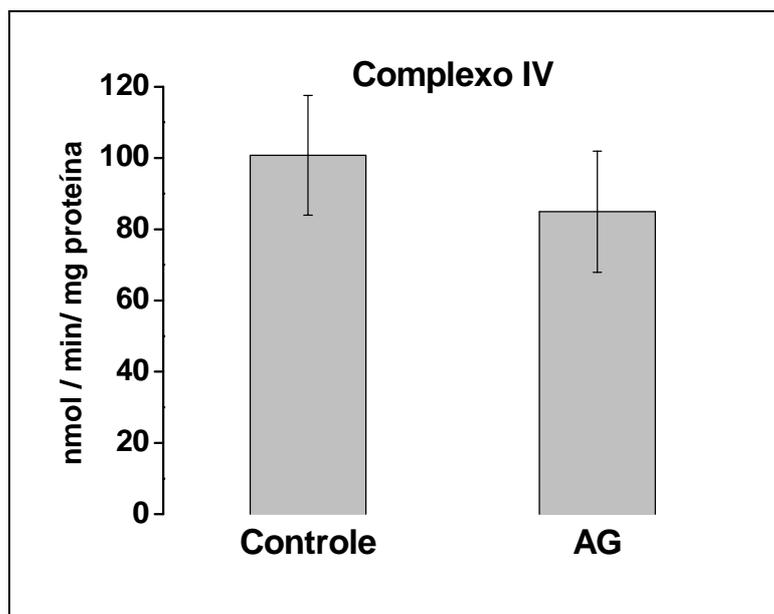


Figura 4.10. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de músculo esquelético de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em nmol de citocromo *c* oxidado / min / mg de proteína) \pm erro padrão (n=5). A diferença entre as médias foi calculada pelo teste *t* de Student para amostras independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

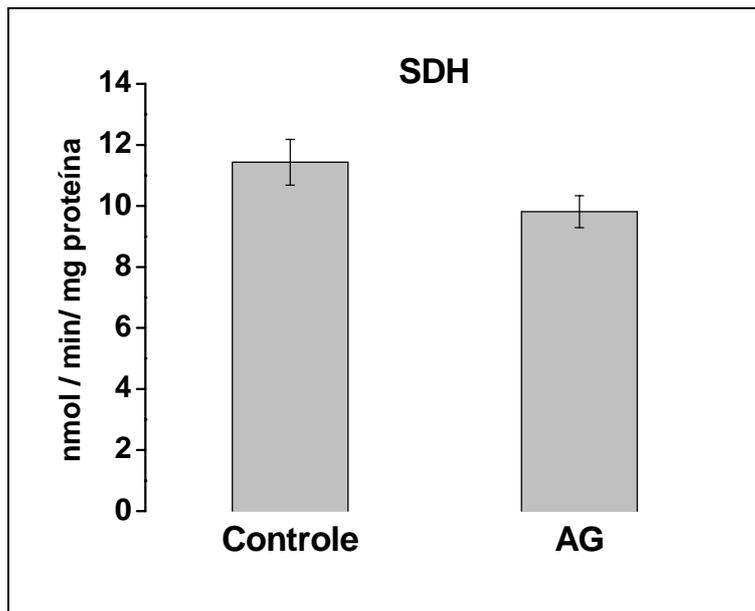


Figura 4.11. Efeito da administração do AG sobre a atividade da enzima SDH em homogeneizados de músculo esquelético de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em nmol de DCIP reduzido / min / mg de proteína) \pm erro padrão (n=5). A diferença entre as médias foi calculada pelo teste *t* de Student para amostras independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.2.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE A ATIVIDADE DOS COMPLEXOS ENZIMÁTICOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA EM HOMOGENEIZADOS DE MÚSCULO CARDÍACO DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE

A seguir, investigou-se o efeito da administração de AG sobre as atividades dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória em homogeneizados de músculo cardíaco de ratos jovens. Verificamos que a administração do ácido não teve efeito significativo sobre a atividade dos complexos I-III [$t(8) = 0,918$; $p > 0,05$] (figura 4.12), II [$t(8) = 0,856$; $p > 0,05$] (figura 4.13), II-III [$t(8) = 0,732$; $p > 0,05$] (figura 4.14), IV [$t(8) = 1,480$; $p > 0,05$] (figura 4.15) e sobre a atividade da enzima succinato desidrogenase [$t(8) = 1,394$; $p > 0,05$] (figura 4.16).

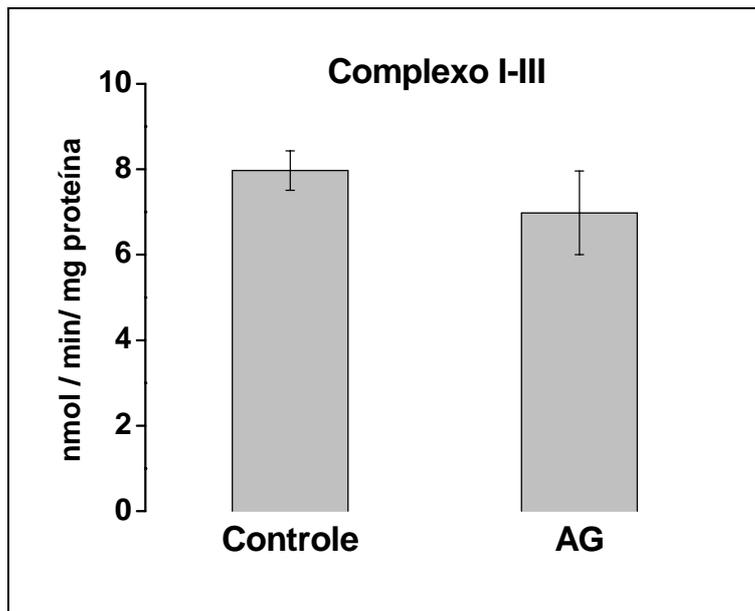


Figura 4.12. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória em homogeneizados de músculo cardíaco de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em nmol de citocromo c reduzido / min / mg de proteína) \pm erro padrão (n=5). A diferença entre as médias foi calculada pelo teste *t* de Student para amostras independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

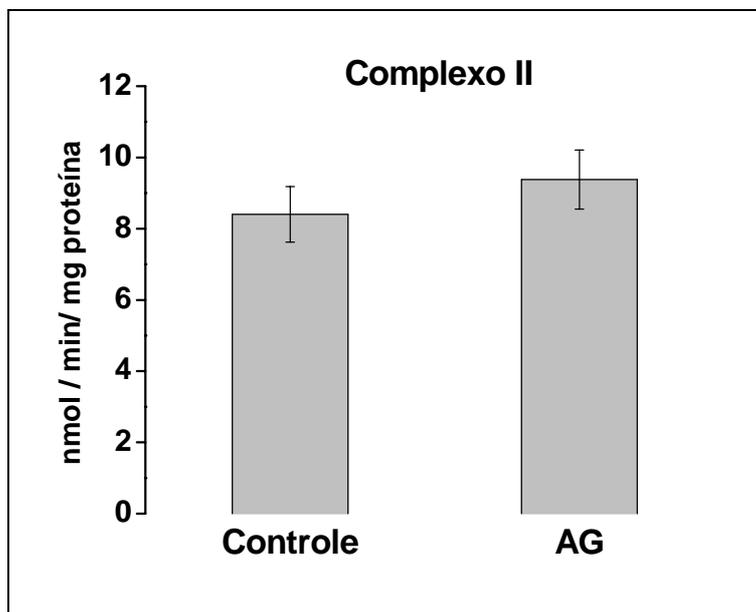


Figura 4.13. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de músculo esquelético de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em nmol de DCIP reduzido / min / mg de proteína) \pm erro padrão (n=5). A diferença entre as médias foi calculada pelo teste *t* de Student para amostras independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

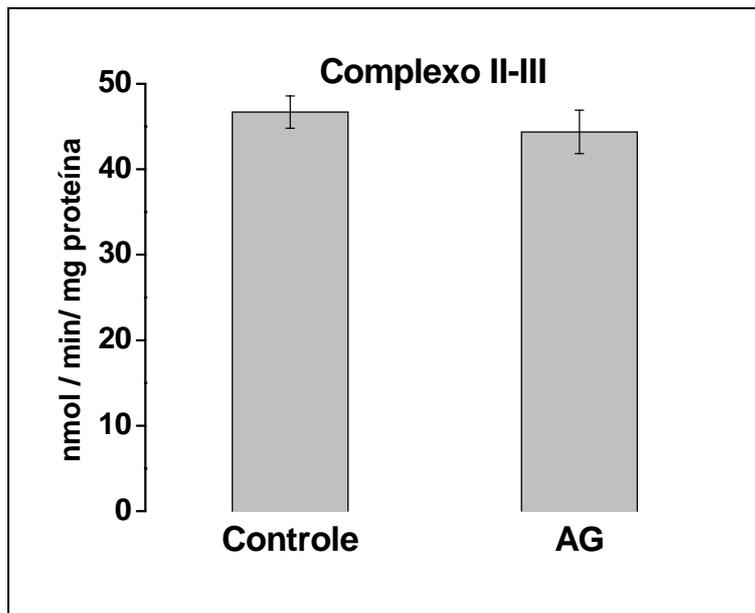


Figura 4.14. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória em homogeneizados de músculo cardíaco de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em nmol de citocromo *c* reduzido / min / mg de proteína) \pm erro padrão (n=5). A diferença entre as médias foi calculada pelo teste *t* de Student para amostras independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

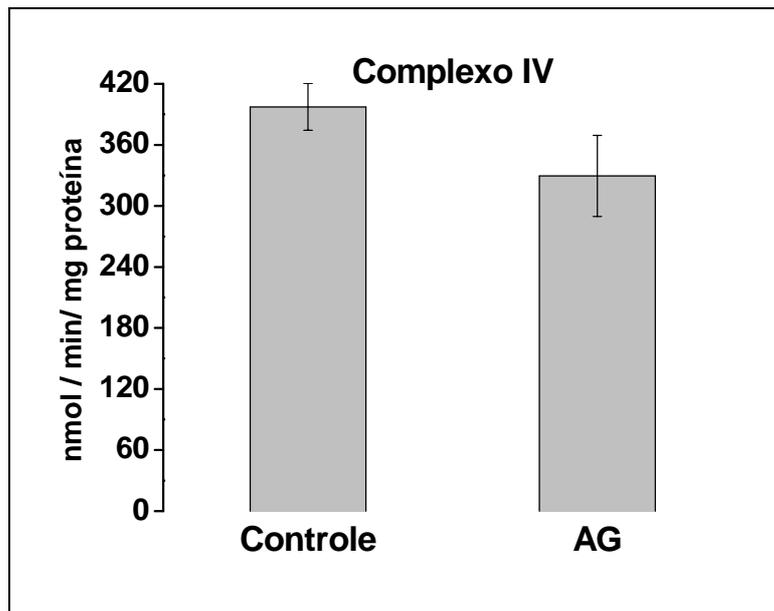


Figura 4.15. Efeito da administração do AG sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de músculo cardíaco de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em nmol de citocromo *c* oxidado / min / mg de proteína) \pm erro padrão (n=5). A diferença entre as médias foi calculada pelo teste *t* de Student para amostras independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

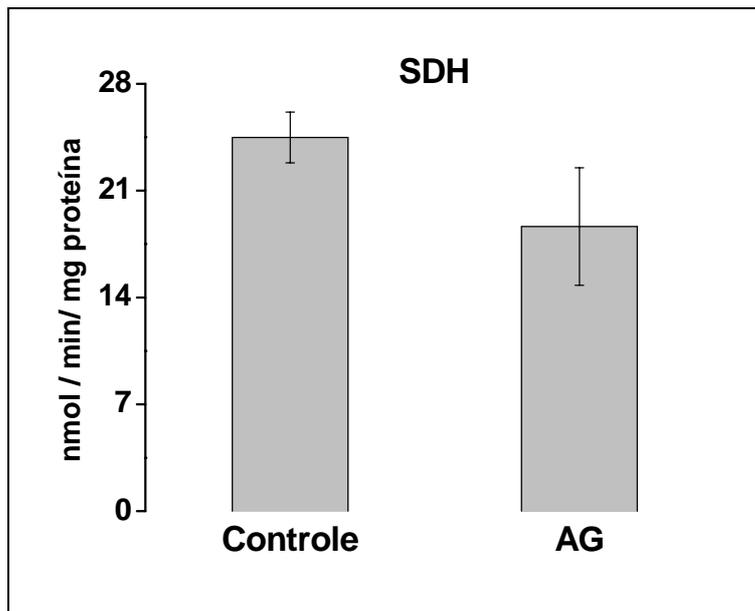


Figura 4.16. Efeito da administração do AG sobre a atividade da enzima SDH em homogeneizados de músculo cardíaco de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em nmol de DCIP reduzido / min / mg de proteína) \pm erro padrão (n=5). A diferença entre as médias foi calculada pelo teste *t* de Student para amostras independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.2.5 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE A ATIVIDADE TOTAL DA CREATINA QUINASE (CK TOTAL) EM HOMOGENEIZADOS DE CÉREBRO MÉDIO DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE

A figura 4.17 mostra que a administração do AG não exerceu nenhum efeito significativo sobre a atividade total da enzima CK em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens [$t(13) = 0,047$; $p > 0,05$].

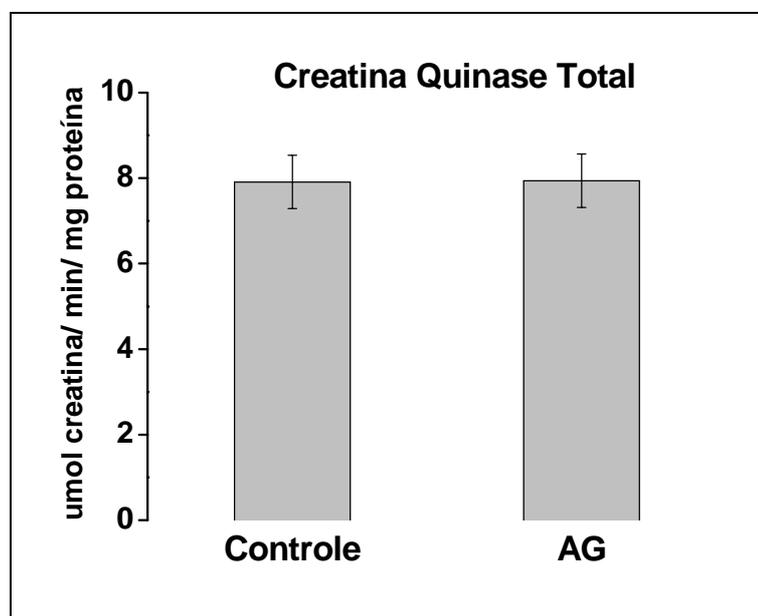


Figura 4.17. Efeito da administração do AG sobre a atividade total da enzima creatina quinase (CK total) em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em μmol de creatina formada / min / mg de proteína) \pm erro padrão ($n=7-8$). A diferença entre as médias foi calculada pelo teste t de Student para amostras independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.2.6 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE A ATIVIDADE TOTAL DA CREATINA QUINASE (CK TOTAL) EM HOMOGENEIZADOS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE

Observamos na figura 4.18 mostra que a administração do AG não exerceu nenhum efeito significativo sobre a atividade total da enzima CK em homogeneizados de músculo esquelético de ratos jovens [$t(9) = 1,531$; $p > 0,05$].

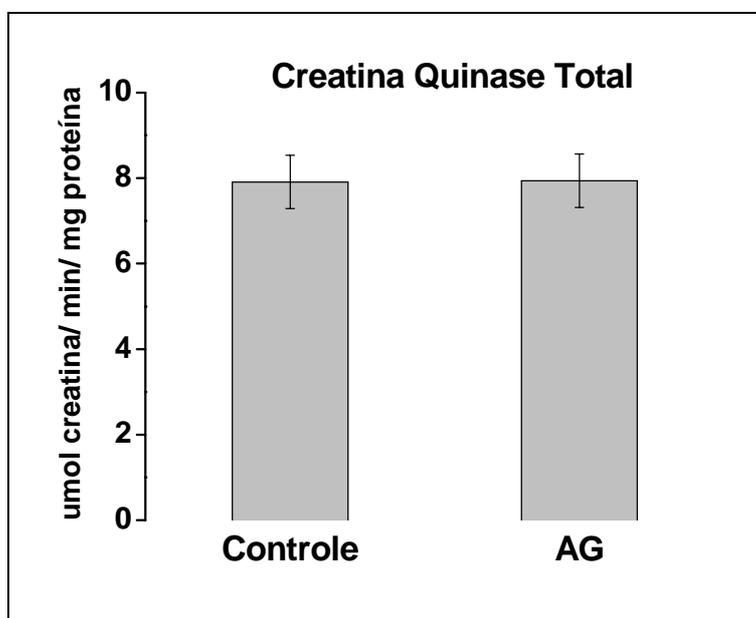


Figura 4.18. Efeito da administração do AG sobre a atividade total da enzima creatina quinase (CK total) em homogeneizados de músculo esquelético de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em μmol de creatina formada / min / mg de proteína) \pm erro padrão ($n=5-6$). A diferença entre as médias foi calculada pelo teste t de Student para amostras independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.2.7 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE A ATIVIDADE TOTAL DA CREATINA QUINASE (CK TOTAL) EM HOMOGENEIZADOS DE MÚSCULO CARDÍACO DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE

Pode-se notar na figura 4.19 mostra que a administração do AG não exerceu nenhum efeito significativo sobre a atividade total da enzima CK em homogeneizados de músculo cardíaco de ratos jovens [$t(9) = 1,082$; $p > 0,05$].

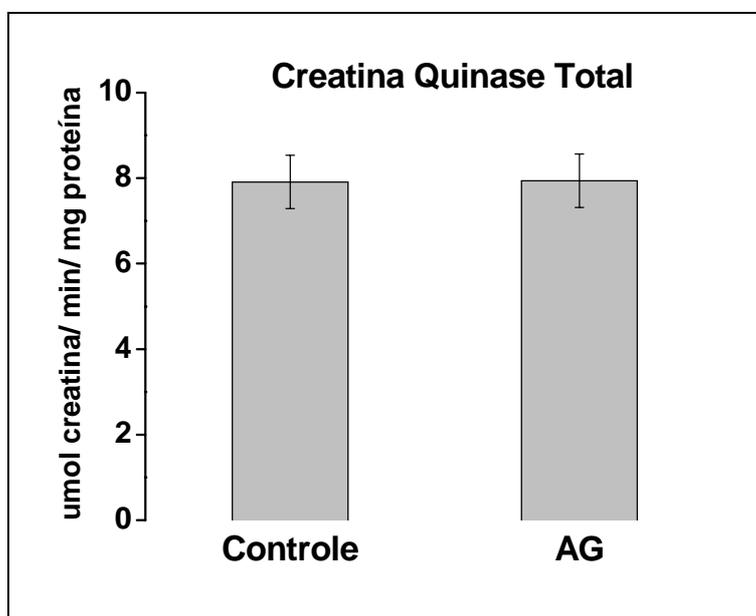


Figura 4.19. Efeito da administração do AG sobre a atividade total da enzima creatina quinase (CK total) em homogeneizados de músculo cardíaco de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em μmol de creatina formada / min / mg de proteína) \pm erro padrão ($n=5-6$). A diferença entre as médias foi calculada pelo teste t de Student para amostras independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.3 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA ADIÇÃO *IN VITRO* DO ÁCIDO GLUTÁRICO SOBRE VÁRIOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL

O próximo passo de nossa investigação foi estudar o efeito *in vitro* do AG sobre os mesmos parâmetros bioquímicos do metabolismo energético para podermos comparar os resultados da administração do ácido com o tratamento *in vivo*. Neste caso, o AG foi adicionado em várias concentrações aos meios de incubação.

4.3.1 EFEITO *IN VITRO* DO ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE A PRODUÇÃO DE CO₂ A PARTIR DE GLICOSE E ACETATO EM HOMOGENEIZADOS DE CÉREBRO MÉDIO DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE

As figuras 4.20 e 4.21 mostram que, nas concentrações testadas, o AG não inibiu significativamente a produção de CO₂ a partir de glicose [F(3,18)= 0,225; p >0,05] e acetato [F(3,19)=0,442; p > 0,05], respectivamente.

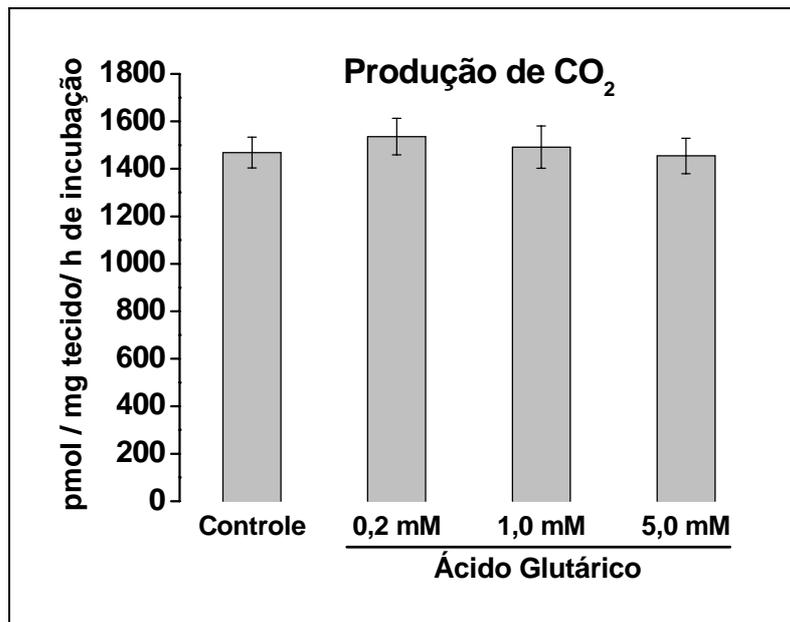


Figura 4.20. Efeito *in vitro* do AG sobre a produção de CO₂ a partir de glicose em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em pmol de glicose convertida a CO₂ / mg de tecido / hora de incubação) ± erro padrão (n=5-6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

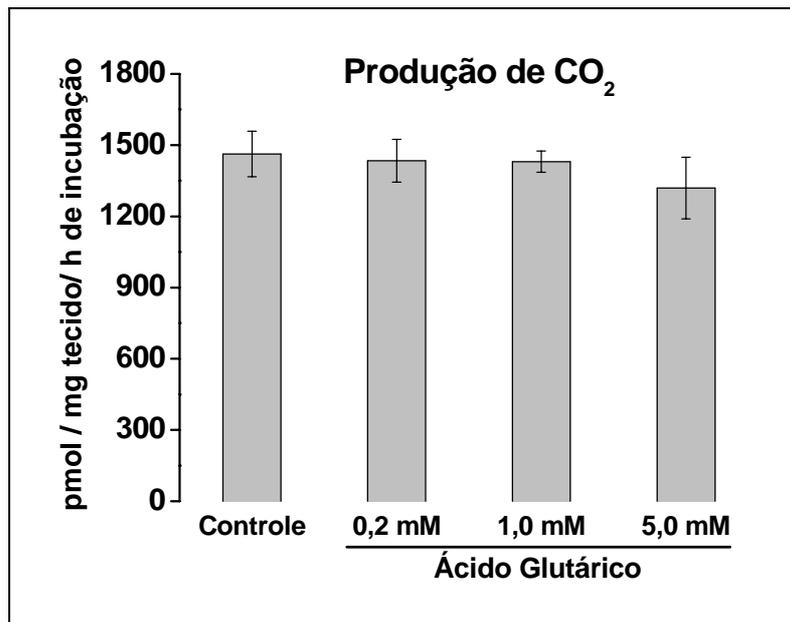


Figura 4.21. Efeito *in vitro* do AG sobre a produção de CO₂ a partir de acetato em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em pmol de acetato convertido a CO₂ / mg de tecido / hora de incubação) ± erro padrão (n=5-6). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.3.2 EFEITO *IN VITRO* DO ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE AS ATIVIDADES DOS COMPLEXOS ENZIMÁTICOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA EM HOMOGENEIZADOS DE CÉREBRO MÉDIO DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE

Foi observado que o AG não exerceu efeito significativo *in vitro* sobre a atividade dos complexos II [$F(3,20) = 1,494$; $p > 0,05$] (figura 4.23), II-III [$F(3,20) = 0,556$; $p > 0,05$] (figura 4.24) e IV [$F(3,20) = 0,167$; $p > 0,05$] (figura 4.25). Por outro lado, verificamos que o AG na concentração de 5 mM inibiu as atividades do complexo I-III da cadeia respiratória [$t(4) = 2,776$; $p < 0,05$] (figura 4.22) e da enzima succinato desidrogenase [$F(3,20) = 10,013$; $p < 0,01$] (figura 4.26).

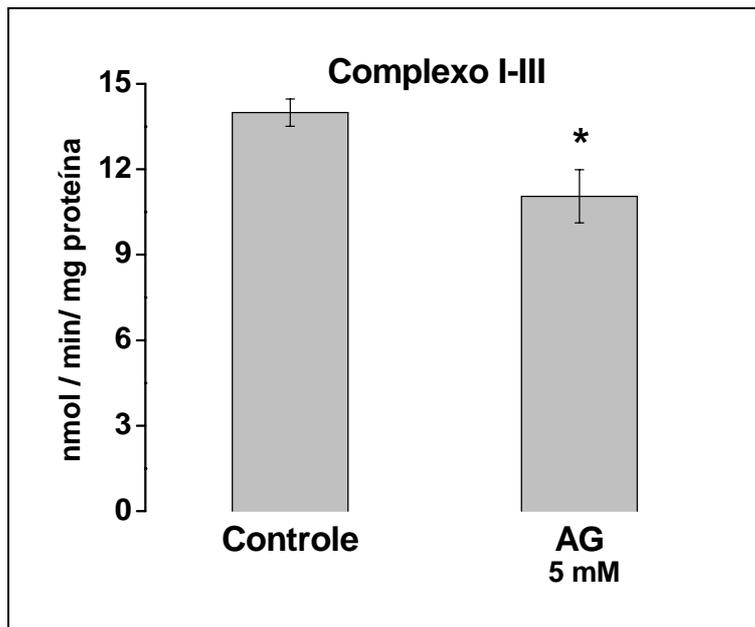


Figura 4.22. Efeito *in vitro* do AG sobre a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em nmol de citocromo *c* reduzido / min / mg de proteína) \pm erro padrão (n=5). Os resultados foram analisados por teste *t* de Student para amostras não pareadas (*p <0,05, comparado ao controle)

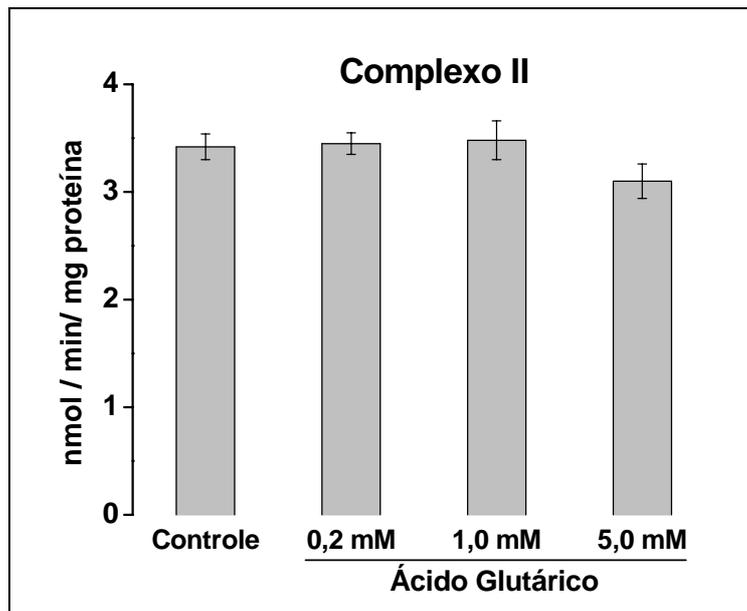


Figura 4.23. Efeito *in vitro* do AG sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em nmol de DCIP reduzido / min / mg de proteína) \pm erro padrão (n=6). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

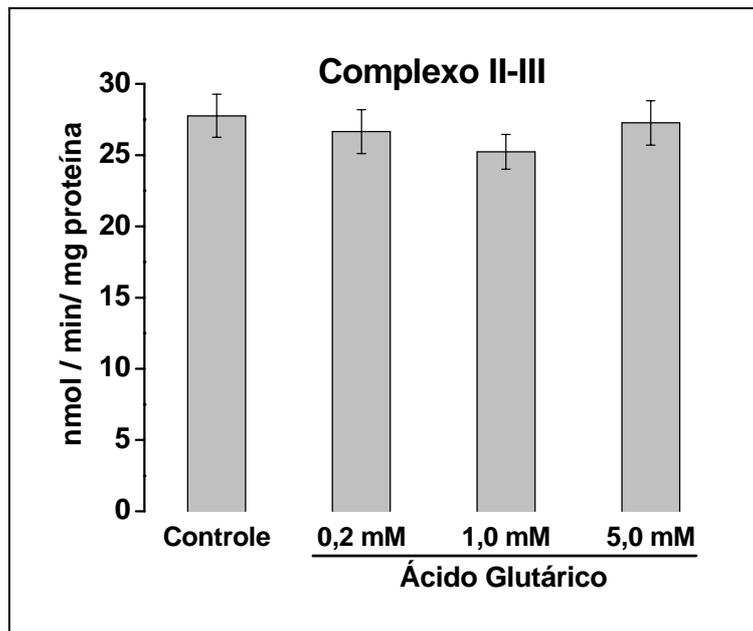


Figura 4.24. Efeito *in vitro* do AG sobre a atividade do complexo II-III da cadeia respiratória em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens.

Os valores representam média (expressa em nmol de citocromo c reduzido / min / mg de proteína) \pm erro padrão (n=6). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

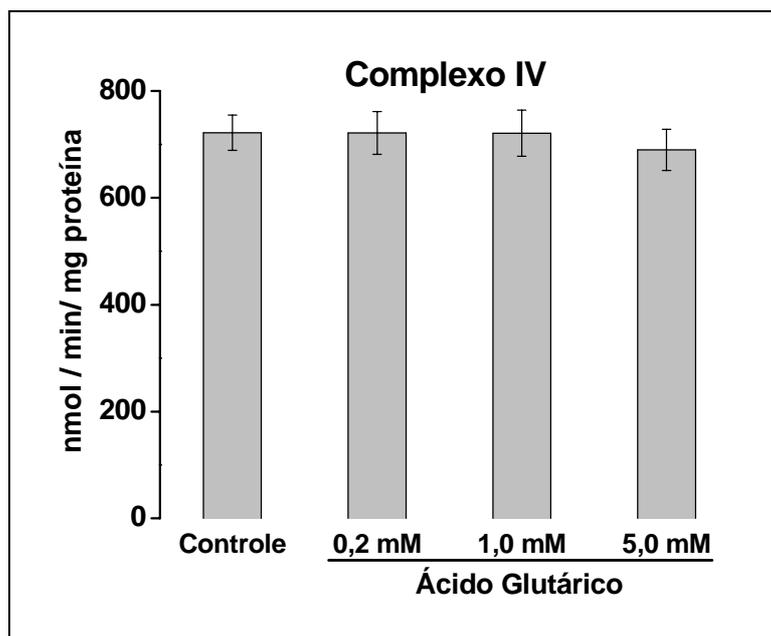


Figura 4.25. Efeito *in vitro* do AG sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em nmol de citocromo *c* oxidado / min / mg de proteína) \pm erro padrão (n=5-6). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

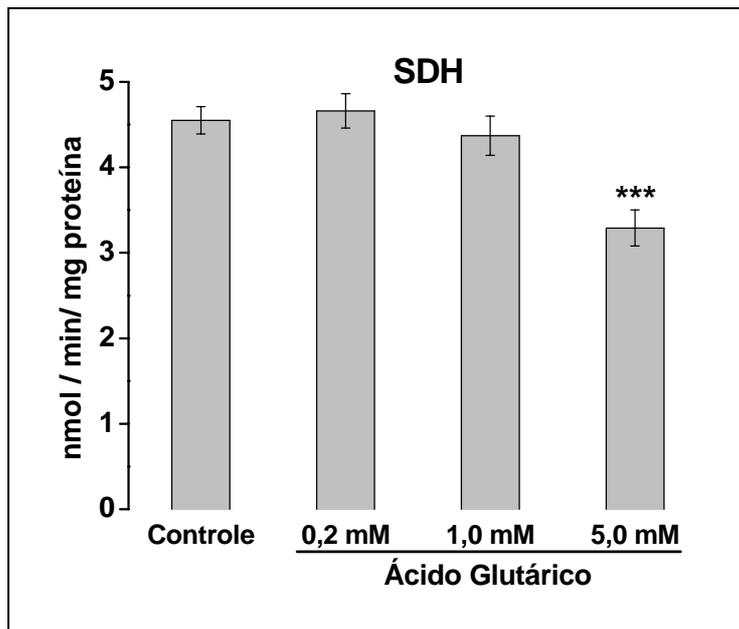


Figura 4.26. Efeito in vitro do AG sobre a atividade da enzima SDH em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em nmol de DCIP reduzido / min / mg de proteína) \pm erro padrão (n=6). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de Duncan (**p < 0,001, comparado ao controle).

4.3.3 EFEITO *IN VITRO* DO ÁCIDO GLUTÁRICO (AG) SOBRE A ATIVIDADE TOTAL DA CREATINA QUINASE (CK TOTAL) EM HOMOGENEIZADOS DE CÉREBRO MÉDIO DE RATOS DE 21 DIAS DE IDADE

A figura 4.27 mostra que o AG não exerceu nenhum efeito sobre a atividade total da enzima CK em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens [F(3,20)= 1,234; p >0,05].

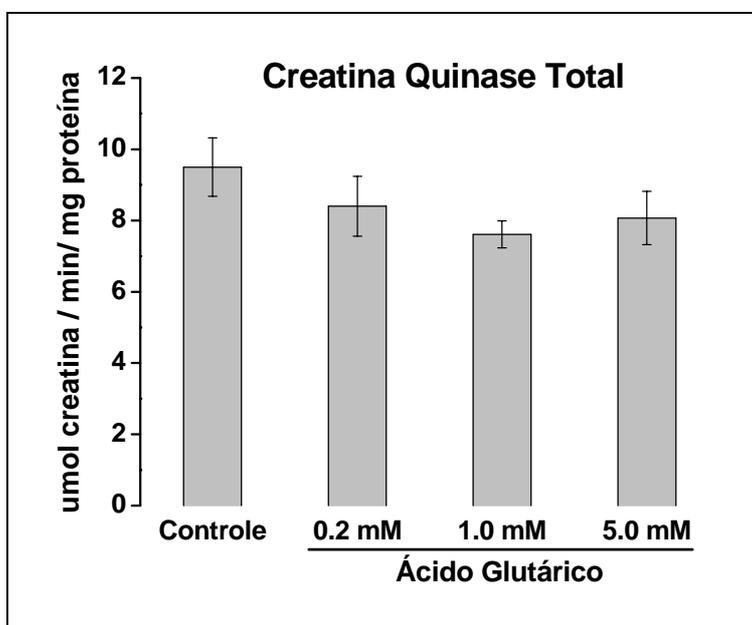


Figura 4.27. Efeito *in vitro* do AG sobre a atividade total da enzima creatina quinase (CK total) em homogeneizados de cérebro médio de ratos jovens. Os valores representam média (expressa em μmol de creatina formada / min / mg de proteína) \pm erro padrão (n=6). Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

5 DISCUSSÃO

A acidemia glutárica tipo I (AG I) caracteriza-se por uma hipomielinização ou desmielinização progressiva do córtex cerebral que pode se observar ao nascimento com atrofia do lobo frontal e, principalmente, do lobo temporal. Tais sintomas aparecem com a criança ainda no útero materno com o desenvolvimento de hidrocefalia, e, ao nascer, muitas apresentam macrocefalia. O que parece, no entanto, ser fundamental para o curso clínico da doença, é uma degeneração estriatal importante que ocorre durante as crises encefalopáticas nos pacientes principalmente entre os 3 e os 36 meses de vida, seguindo-se a situações associadas a eventos altamente catabólicos, tais como infecções, vacinas e cirurgias. Após essas crises, os pacientes apresentam distonia e discinesia que progride rapidamente e os incapacita para as atividades normais (Hoffmann & Zschocke, 1999). Embora diversos estudos já tenham sido realizados, os mecanismos de lesão estriatal nesses pacientes não estão definidos e continuam sendo investigados.

Acredita-se que os metabólitos acumulados nessa doença, os ácidos glutárico (AG) e 3-hidroxiglutárico (3-OHAG), e algumas vezes, o ácido *trans*-glutacônico, sejam os principais responsáveis pelas lesões cerebrais. Além destes compostos, glutarilcarnitina e derivados CoA (como glutaril-CoA) também encontram-se acumulados nesta doença e poderiam exercer um papel na fisiopatologia da AG I.

A excitotoxicidade tem sido considerada um mecanismo essencial para o dano cerebral nos pacientes com AG I. Imagina-se que os ácidos acumulados na

doença, principalmente o 3-OHAG, possam atuar como toxinas excitotóxicas (Flott-Rahmel *et al.*, 1997; Kölker *et al.*, 1999; 2000 a, b). Foi verificado que o ácido 3-OHAG atua ativando receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, atuando como um agonista fraco (Kölker *et al.*, 2000 a, 2001 a, b; Rosa *et al.*, 2004). Este ácido agiria estimulando especificamente as subunidades NR1/NR2B dos receptores NMDA. A extensão da neurotoxicidade induzida seria dependente da expressão destas subunidades durante a maturação neuronal ao longo do desenvolvimento. Assim, acredita-se que a alta expressão de receptores NR1/2B na fase mais suscetível da doença, associada a concentrações tóxicas de 3-OHAG seriam as condições necessárias para a indução de crises encefalopáticas agudas na AG I. Por outro lado, concentrações subtóxicas de 3-OHAG não causariam uma doença excitotóxica, mas levariam a um *down-regulation* dos receptores NR1/2B *in vitro* e induziriam um atraso na maturação neuronal. Ainda, foi verificado que AG aumenta a interação entre glutamato e receptores glutamatérgicos metabotrópicos e do tipo AMPA, indicando também um papel excitotóxico deste ácido (Wajner *et al.*, 2004). Também foi demonstrado que este ácido provoca dano celular a culturas organotípicas corticoestriatais (Whetsell & Schwarcz, 1983), inibição da captação de glutamato por sinaptossomas de ratos e da interação entre glutamato e seus transportadores em córtex cerebral de ratos, sugerindo que o ácido interage com sítios transportadores de glutamato (Porciúncula *et al.*, 2000). Um efeito estimulatório deste ácido sobre receptores de glutamato metabotrópicos e ionotrópicos do tipo AMPA em baixas concentrações também foi reportado, não alterando porém a interação com receptores do tipo NMDA e kainato (Porciúncula *et al.*, 2004). Esse fato poderia explicar o fato de

que convulsões tonico-clônicas provocadas por injeções intraestriatais deste ácido foram prevenidas por DNQX, um antagonista de receptores AMPA, mas não por MK-801, um antagonista de receptores NMDA (Lima *et al.*, 1998). Por último, foi demonstrado que AG inibe a captação de glutamato a vesículas sinápticas de córtex cerebral, indicando que poderia estar havendo um prejuízo no *turnover* de glutamato da fenda sináptica e no ciclo glutamato-gutamina entre astrócitos e neurônios. Essas alterações indicam que um desequilíbrio dos sistemas glutamatérgicos e GABAérgicos pode levar à excitotoxicidade nestes pacientes. Neste sentido, convém enfatizar que concentrações reduzidas de GABA foram detectadas nos gânglios da base de pacientes afetados por AG I (Leibel *et al.*, 1980).

Estudos recentes, entretanto, não indicam que a excitotoxicidade seja o principal mecanismo de morte neuronal causada pelo 3-OHAG (Bjugstad *et al.*, 2001; Lund *et al.*, 2004). Neste sentido, o estresse oxidativo também parece estar envolvido na fisiopatologia das características alterações neurológicas dos pacientes. Neste contexto, foi demonstrado que o tratamento *in vitro* com 3-OHAG em cultura neuronal de pinto induz a produção de espécies reativas de oxigênio, que foi prevenida pela co-incubação com MK-801, que é um antagonista de receptores NMDA, ou α -tocoferol ou melatonina. Neste mesmo sistema, foi demonstrada uma maior produção de óxido nítrico, mas o tratamento com L-NAME, que é um inibidor da óxido nítrico sintase (NOS), não evitou a morte neuronal (Kölker *et al.*, 2001a). Entretanto, em culturas de hipocampo de ratos foi demonstrado um aumento na expressão da enzima óxido nítrico sintase quando

as células foram tratadas com 3-OHAG juntamente com interleucina-1 β e interferon- δ durante 24 hs, mas tal efeito não foi observado quando incubados separadamente. Tais resultados indicaram que a neurotoxicidade do 3-OHAG é potencializada pela indução da NOS e indica uma participação do sistema neuro-imunológico inflamatório nas crises encefalopáticas agudas características desta doença (Kölker *et al.*, 2001b).

Foi também demonstrado que o tratamento com os ácidos 3-OHAG e AG diminui as defesas antioxidantes, induzem peroxidação lipídica e formação de espécies reativas, particularmente de óxido nítrico, em córtex cerebral e estriado de ratos jovens (Latini *et al.*, 2002, 2005; de Oliveira Marques *et al.*, 2003). Em conjunto, todas estas evidências sugerem fortemente que um desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes pode estar envolvido na fisiopatogenia da AG I.

Por último, foi proposto que alterações no metabolismo energético poderiam ser responsáveis pelo dano cortico-estriatal característico dos pacientes afetados por AG I (Ullrich *et al.*, 1999; Strauss & Morton, 2003). Assim, foi demonstrado que o ácido 3-OHAG inibe os complexos II e V da cadeia respiratória (Ullrich *et al.*, 1999), e que este ácido estaria provavelmente envolvido no dano estriatal causado por um distúrbio do metabolismo energético (Strauss & Morton, 2003). No entanto, outros pesquisadores demonstraram que o 3-OHGA não inibe os complexos da cadeia respiratória isoladamente em subpartículas mitocondriais de coração bovino. Em relação ao AG, que é o metabólito mais acumulado nesta doença, foi verificado que este ácido inibe *in vitro* os complexos I-III e II-III da cadeia respiratória e diminui a produção de CO₂ e dos níveis de ATP em

homogeneizados de córtex cerebral de ratos (Silva *et al.*, 2000), resultados que são conflitantes com outros encontrados na literatura (Ullrich *et al.*, 1999).

Assim, embora vários mecanismos tenham sido apontados como responsáveis pela neurodegeneração estriatal nenhum dos efeitos propostos tomado isoladamente parece ser potente o suficiente para induzir um dano cerebral compatível com a extensão de lesão estriatal encontrada em pacientes após as crises encefalopáticas. Recentemente, foi proposto que uma inibição do metabolismo energético possa ser um mecanismo crucial para explicar a lesão estriatal nesta doença (Strauss & Morton, 2003). Os autores desta proposta basearam-se na lesão estriatal específica causada pelo ácido 3-nitropropiónico, muito semelhante à encontrada nos pacientes com AG I, e propuseram um modelo animal através da injeção desta neurotoxina. Neste sentido, é possível que uma disfunção mitocondrial possa desencadear uma série de eventos tóxicos que ocorreriam em cascata, incluindo excitotoxicidade, geração de ROS, indução da NOS e posterior inibição do metabolismo energético em um ciclo vicioso, sendo que a instalação de um destes processos facilitaria e amplificaria a instalação de outro.

Portanto, considerando que os mecanismos que levam ao dano estriatal da AG I ainda não estão esclarecidos e que o AG é o principal metabólito acumulado nesta doença, o objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito *in vivo* e *in vitro* do AG sobre parâmetros importantes do metabolismo energético em cérebro médio de ratos, região onde está localizado o estriado, que é a estrutura cerebral mais afetada na AG I. Inicialmente, desenvolvemos um modelo químico experimental de AG I através da administração subcutânea do AG na dose de 5

$\mu\text{mol/g}$ a ratos de 7, 14 e 21 dias de vida com o objetivo de atingir níveis cerebrais de aproximadamente $0,5 \mu\text{mol/g}$ ($\sim 0,5 \text{ mM}$), tal como descrito nos pacientes com AG I (Goodman *et al.*, 1975, 1977). Verificamos que os níveis séricos alcançados foram aproximadamente dez vezes maiores (6 mM) do que os cerebrais, provavelmente pela seletividade da barreira hemato-encefálica. É interessante observar-se que em modelos de outras acidemias, tais como a acidemia metilmalônica e a propiônica (Dutra *et al.*, 1991; Brusque *et al.*, 1997) a dose administrada aos animais da mesma idade foi 4 - 8 vezes menor e a concentração alcançada no cérebro foi superior ($\sim 1 \text{ mM}$), enquanto os níveis séricos foram aproximadamente de $2,5$ e 5 mM , respectivamente. Tais resultados sugerem que o transporte do AG por membranas celulares e pela barreira hemato-encefálica é mais difícil, comparado ao dos ácidos metilmalônico e propiônico. Verificamos também que a penetração do AG nos músculos cardíaco e esquelético foi mais efetiva do que no tecido cerebral, visto que os valores de AG atingidos nesses tecidos foram aproximadamente 5 vezes maiores do que no cérebro. Esses dados reforçam a idéia de que a barreira hemato-encefálica seja menos permeável ao AG do que outras membranas celulares. Podemos também supor que, como essa barreira impõe dificuldades na entrada deste ácido, o mesmo aconteceria no sentido inverso deste transporte, isto é, haveria uma dificuldade na saída desse ácido das células neurais. Nesse particular, convém salientar que se considera a AG I uma acidemia orgânica cerebral, pois os pacientes afetados apresentam predominantemente sintomas neurológicos (Hoffmann *et al.*, 1993, 1994). Em resumo, é possível que nessa doença a saída do AG do cérebro após eventos catabólicos como vacinação, cirurgias ou infecções seja lenta, aumentando as

suas concentrações no tecido neural e contribuindo para esses sintomas. Neste contexto, foi demonstrado recentemente que a concentração do AG medida *postmortem* no cérebro de dois pacientes falecidos por AG I atingiram até 8 mM (Kölker *et al.*, 2004), o que está de acordo com esta hipótese. Deve-se também salientar que em vários pacientes com AG I não se consegue detectar o AG nos líquidos corporais, reforçando a idéia de seqüestramento deste ácido no SNC por deficiência no transporte do mesmo (Hoffmann *et al.*, 1996^a; Pineda *et al.*, 1998).

Verificamos ainda em nosso modelo que os parâmetros farmacocinéticos volume de distribuição e depuração plasmática aumentam com o avanço da idade, enquanto o tempo de meia-vida plasmática diminui, provavelmente devido à maturação do sistema renal (excreção urinária aumenta com o avanço da idade) e de outros órgãos periféricos.

A idéia de desenvolver um modelo experimental animal químico de AG I, através da administração de AG I a ratos jovens, tem a vantagem de estudar isoladamente o efeito do AG sobre diferentes parâmetros bioquímicos e neurocomportamentais. No modelo *knock-out* de AG I recentemente desenvolvido (Koeller *et al.*, 2002), apesar dos níveis dos ácidos atingirem valores bastante similares às encontradas em pacientes afetados, o mesmo não mimetiza a doença humana, pois não apresenta a lesão estriatal característica. Além disso, os vários metabólitos encontram-se simultaneamente acumulados, o que impossibilita a investigação do efeito isolado de cada um.

Verificamos que a administração subcutânea aguda de AG a ratos de 21 dias de idade não alterou a produção de CO₂ a partir de glicose em cérebro médio dos ratos e tampouco alterou a atividade total da enzima creatina quinase em

cérebro médio, músculo cardíaco e músculo esquelético dos animais. Por outro lado, a atividade do complexo I-III foi significativamente inibida (25%) pela administração do AG no cérebro médio dos animais enquanto todas as outras atividades enzimáticas da cadeia respiratória não foram afetadas. Já no músculo esquelético, além da inibição do complexo I-III (25%), observamos que a atividade do complexo II-III também foi significativamente inibida (15%). Por outro lado, a administração do AG não afetou a atividade dos complexos da cadeia respiratória em músculo cardíaco, onde as concentrações do AG foram semelhantes à do músculo esquelético. Portanto, é possível que este efeito diferenciado do AG seja tecido-específico, o que pode estar relacionado com diferentes isoformas desses complexos em vários tecidos (Capaldi *et al.*, 1998). Os resultados encontrados em músculo cardíaco de ratos foram semelhantes às encontradas com 3-OHAG em músculo cardíaco bovino e está de acordo com a clínica dos pacientes que não apresentam problemas cardíacos. Por outro lado, hipotonia é comum nesses pacientes, o que estaria de acordo com uma inibição da cadeia respiratória neste tecido e conseqüente redução na síntese de ATP.

Também estudamos o efeito *in vitro* do AG sobre os mesmos parâmetros do metabolismo energético em cérebro médio de ratos de 21 dias de idade. Verificamos que o AG não alterou a produção de CO₂ a partir de glicose ou acetato e tampouco a atividade total da enzima creatina quinase em cérebro médio nas concentrações testadas (0,2, 1 e 5 mM). Em relação às atividades dos complexos da cadeia respiratória, o AG não alterou as atividades dos complexos II, II-III e IV nas concentrações testadas, mas inibiu significativamente as atividades do complexo I-III (20%) e da enzima SDH (30%) no cérebro médio dos

animais. Em resumo, tanto a administração *in vivo* quanto a adição do AG no meio de incubação provocaram uma inibição consistente do complexo I-III da cadeia respiratória no cérebro médio dos ratos de 21 dias de idade. Tendo em vista que somente a presença de 5 mM de AG inibiu a enzima succinato desidrogenase, mas não após a administração do ácido onde as concentrações do mesmo atingem 0,3 $\mu\text{mol/g}$ ($\sim 0,3\text{mM}$), é possível que esta inibição ocorra somente em altas concentrações do ácido. Neste particular, convém salientar que concentrações de AG de até 8 mM foram encontradas *postmortem* no cérebro de dois pacientes com AG I.

Outro fato interessante encontrado em nossa investigação foi uma inibição da SDH sem uma correspondente inibição do complexo II, que é um tetrâmero composto por duas subunidades polipeptídicas catalíticas, que correspondem à succinato desidrogenase solúvel (SDH), e duas subunidades polipeptídicas ancoradas na membrana mitocondrial interna. Essa inibição seletiva possivelmente possa estar relacionada com a utilização de um aceptor artificial de elétrons (metassulfato de fenazina) para a avaliação da atividade SDH, estando relacionada com o fluxo de elétrons até a fenazina.

É importante salientar que percentuais de inibição enzimática similares aos encontrados em nosso estudo têm sido observado em outras doenças neurodegenerativas (Olpin *et al.*, 2002; Brusque *et al.*, 2002).

Previamente havíamos descrito que o AG inibe *in vitro* a produção de CO_2 e de ATP em ratos de 7 dias de vida na concentração de 3mM, bem como os complexos I-III e II-III da cadeia respiratória em córtex cerebral de ratos de 30 dias

de vida. Os resultados do presente trabalho, portanto, não detectaram inibição da produção de CO₂ *in vivo* e *in vitro* em cérebro médio de ratos de 21 dias de vida. É possível, portanto, que os efeitos detectados sobre esse parâmetro sejam devidos a diferenças relacionadas a ontogenia e morfologia das regiões estudadas dos animais.

Em conclusão, detectamos na presente investigação uma inibição consistente da cadeia respiratória a nível do complexo I-III no cérebro médio e a nível dos complexos II-III e II-III no músculo esquelético dos animais provocada pelo AG. Caso estes achados também ocorram na condição humana, um déficit energético poderia contribuir, ao menos em parte, para a característica lesão estriatal bem como pela hipotonia observada em pacientes afetados pela acidemia glutárica do tipo I.

6 CONCLUSÕES

- O ácido glutárico administrado subcutaneamente a ratos de 7, 14 e 21 dias na dose de $5 \mu\text{mol.g}^{-1}$ atingiu concentrações cerebrais em torno de $0,5 \mu\text{mol.g}^{-1}$, valor semelhante ao encontrado em pacientes afetados pela acidemia glutárica tipo I.
- As concentrações do ácido glutárico atingidas por este modelo no plasma, músculo esquelético e músculo cardíaco foram respectivamente em torno de 6, 3 e 4 mM.
- Os parâmetros farmacocinéticos volume de distribuição e depuração plasmática do ácido glutárico aumentaram com avanço da idade dos animais, enquanto o tempo de meia-vida diminuiu.
- A administração subcutânea de ácido glutárico não alterou a produção de CO_2 a partir de glicose em homogeneizados de cérebro médio de ratos de 21 dias de idade.
- A administração subcutânea de ácido glutárico inibiu significativamente a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória no cérebro médio de ratos de 21 dias de idade, sem alterar as atividades dos complexos II, II-III e IV e da enzima succinato desidrogenase.

- A administração subcutânea de ácido glutárico inibiu significativamente as atividades dos complexos I-III e II-III da cadeia respiratória em músculo esquelético de ratos de 21 dias de idade, sem alterar as outras atividades da cadeia respiratória.
- A administração subcutânea de ácido glutárico não alterou significativamente as atividades dos complexos da cadeia respiratória em músculo cardíaco de ratos de 21 dias de idade.
- A administração subcutânea de ácido glutárico não alterou a atividade total da enzima creatina quinase no cérebro médio, músculo esquelético e músculo cardíaco de ratos de 21 dias de idade.
- O ácido glutárico nas concentrações de 0,2, 1 e 5 mM não inibiu significativamente a produção de CO₂ *in vitro* a partir de glicose e acetato em homogeneizados de cérebro médio de ratos de 21 dias de idade.
- A presença de 5 mM do ácido glutárico no meio de incubação resultou em uma inibição significativa da atividade do complexo I-III da cadeia respiratória e da enzima succinato desidrogenase em homogeneizados de cérebro médio de ratos de 21 dias de idade.

- O ácido glutárico nas concentrações de 0,2, 1 e 5 mM não inibiu significativamente a atividade total da enzima creatina quinase em homogeneizados de cérebro médio de ratos de 21 dias de idade.
- Nossos resultados, demonstrando uma inibição da cadeia transportadora de elétrons pelo ácido glutárico, sugerem que esse composto inibe o metabolismo energético no cérebro médio e no músculo esquelético, o que pode contribuir para o dano cerebral e hipotonia características dos pacientes afetados por AG I.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSENOV M, AKSENOVA M, BUTTERFIELD DA et al. Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain. **J. Neurochem.** v. 74, p. 2520-2527, 2000.
- BARIC I, ZSCHOCKE J, CHRISTENSEN E et al. Diagnosis and management of glutaric aciduria type I. **J. Inherit. Metab. Dis.** v.21, p. 326-40, 1998.
- BENNETT MJ, POLLITT RJ, GOODMAN SI et al. Atypical riboflavin-responsive glutaric aciduria, and deficient peroxisomal glutaryl-CoA oxidase activity: a new peroxisomal disorder. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 14, p. 165-73, 1991.
- BENNETT MJ, MARLOW N, POLLITT RJ et al. Glutaric aciduria type 1: biochemical investigations and postmortem findings. **Eur. J. Pediatr.** v. 145, p. 403-5, 1986.
- BERGMAN I, FINEGOLD D, GARTNER JC JR et al. Acute profound dystonia in infants with glutaric acidemia. **Pediatrics.** v. 83, p. 228-34, 1989.
- BIERY BJ, STEIN DE, MORTON DH et al. Gene structure and mutations of glutaryl-coenzyme A dehydrogenase: impaired association of enzyme subunits that is due to an A421V substitution causes glutaric acidemia type I in the Amish. **Am. J. Hum. Genet.** v. 59, p.1006-11, 1996.
- BJUGSTAD KB, ZAWADA WM, GOODMAN S et al. IGF-1 and bFGF reduce glutaric acid and 3-hydroxyglutaric acid toxicity in striatal cultures. **J Inherit Metab Dis.** v.24, p. 631-47, 2001.
- BRANDT NJ, GREGERSEN N, CHRISTENSEN E et al. Treatment of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency (glutaric aciduria). Experience with diet, riboflavin, and GABA analogue. **J. Pediatr.** v. 94, p. 669-73, 1979.
- BRUSQUE AM, BORBA ROSA R, SCHUCK PF et al. Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid. **Neurochem. Int.** v. 40, p. 593-601, 2002.
- BRUSQUE AM. Efeito da administração crônica pós-natal de propionato sobre o desenvolvimento neuropsicomotor e comportamental de ratos Wistar. **Dissertação de Mestrado.** Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.

- BURLINA AP, ZARA G, HOFFMANN GF et al. Management of movement disorders in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency: anticholinergic drugs and botulinum toxin as additional therapeutic options. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 27, p. 911-5, 2004.
- BURTON BK. Inborn Errors of Metabolism: The clinical diagnosis in early infancy. **Pediatrics.** v. 79, p. 359, 1987.
- BUSQUETS C, MERINERO B, CHRISTENSEN E et al. Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency in Spain: evidence of two groups of patients, genetically, and biochemically distinct. **Pediatr. Res.** v. 48, p. 315-22, 2000.
- CAMPISTOL J, RIBES A, ALVAREZ L et al. Glutaric aciduria type I: unusual biochemical presentation. **J. Pediatr.** v. 121, p. 83-6, 1992.
- CAPALDI RA. Mitochondrial myopathies and respiratory chain proteins. **Trends. Biochem. Sci.** v. 13, p. 144-8, 1998.
- CHALMERS RA, LAWSON AM. **Organic acids in man. Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias.** London: Chapman & Hall, p. 221-229, 1982.
- CHALMERS RA, PURKISS P, WATTS et al. Screening for organic acidurias and amino acidopathies in newborns and children. **J. Inher. Metab. Dis.** v. 3, p. 27-29, 1980.
- CHRISTENSEN E, RIBES A, MERINERO B et al. Correlation of genotype and phenotype in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 27, p. 861-8, 2004.
- CHRISTENSEN E. A fibroblast glutaryl-CoA dehydrogenase assay using detritiation of 3H-labelled glutaryl-CoA: application in the genotyping of the glutaryl-CoA dehydrogenase locus. **Clin. Chim. Acta.** v. 220, p. 71-80, 1993.
- CHRISTENSEN E, BRANDT NJ. Studies on glutaryl-CoA dehydrogenase in leucocytes, fibroblasts and amniotic fluid cells. The normal enzyme and the mutant form in patients with glutaric aciduria. **Clin. Chim. Acta.** v. 88, p. 267-76, 1978.
- CLARK JB, BATES TE, CULLINGFORD T. et al. Development of enzymes of energy metabolism in the neonatal mammalian brain. **Dev. Neurosci-Basel.** v. 17, p. 174-180, 1993.

- CREMER JE, BRAUN LD, OLDENDORF WH. Changes during development in transport process of the blood-brain barrier. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 448, p. 633-637, 1976.
- CRONE C. Facilitated transfer of glucose from blood into brain tissue. **J. Physiol.** (Lond) v. 181, 103-106, 1965.
- DAS AM, LUCKE T, ULLRICH K. Glutaric aciduria I: creatine supplementation restores creatinephosphate levels in mixed cortex cells from rat incubated with 3-hydroxyglutarate. **Mol. Genet. Metab.** v. 78, p. 108-11, 2003.
- DA SILVA CG, BUENO AR, SCHUCK PF et al. Inhibition of creatine kinase activity from rat cerebral cortex by D-2-hydroxyglutaric acid in vitro. **Neurochem. Int.** v. 44, p. 45-52, 2004.
- DE OLIVEIRA MARQUES F, HAGEN ME et al. Glutaric acid induces oxidative stress in brain of young rats. **Brain. Res.** v. 964, p. 153-8, 2003.
- DICKINSON CJ. Cerebral oxidative metabolism in hypertension. **Clin. Sci.** v. 91, p. 539-550, 1996.
- DRIGO P, PIOVAN S, BATTISTELLA PA et al. Macrocephaly, subarachnoid fluid collection, and glutaric aciduria type I. **J. Child. Neurol.** v. 11, p. 414-7, 1996.
- DUNGER DB, SNODGRASS GJ. Glutaric aciduria type I presenting with hypoglycaemia. **J. Inherit. Metab. Dis.** v.7, p. 122-4, 1984.
- DUTRA JC, WAJNER M, WANNMACHER CM et al. Effect of postnatal methylmalonate administration on adult rat behavior. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 24, p. 595-605, 1991.
- ERECINSKA M, SILVER IA. Ions and energy in mammalian brain. **Prog. Neurobiol.** v. 43, p. 37-71, 1994.
- FISCHER JC.; RUITENBEEK W, BERDEN JA. et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clin. Chim. Acta.** v. 153, p. 23-36, 1985.
- FLOTT-RAHMEL B, FALTER C, SCHLUFF P et al. Nerve cell lesions caused by 3-hydroxyglutaric acid: a possible mechanism for neurodegeneration in glutaric acidemia I. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 20, p. 387-90, 1997.

- FUKUDA H, KUDO Y, ONO H. Effects of beta-(p-chlorophenyl)-GABA (baclofen) on spinal synaptic activity. **Eur. J. Pharmacol.** v. 44, p. 17-24, 1977.
- GOODMAN SI, STEIN DE, SCHLESINGER S et al. Glutaryl-CoA dehydrogenase mutations in glutaric acidemia (type I): review and report of thirty novel mutations. **Hum. Mutat.** v.12, p. 141-4, 1998.
- GOODMAN SI, KRATZ LE, DIGIULIO KA et al. Cloning of glutaryl-CoA Dehydrogenase cDNA and expression of wild type and mutant enzymes in Escherichia coli. **Hum. Mol. Genet.** v. 4, p. 1493-1498, 1995.
- GOODMAN SI, NOREMBERG MD, SHIKES RH et al. Glutaric aciduria: biochemical and morphologic considerations. **J. Pediatr.** v. 90, p. 746-50, 1977.
- GOODMAN SI, MARKEY SP, MOE PG et al. Glutaric aciduria: a "new" disorder of amino acid metabolism. **Biochem. Med.** v. 12, p. 12-21, 1975.
- GREENBERG CR, REIMER D, SINGAL R et al. A G-to-T transversion at the +5 position of intron 1 in the glutaryl CoA dehydrogenase gene is associated with the Island Lake variant of glutaric acidemia type I. **Hum. Mol. Genet.** v. 4, p. 493-5, 1995.
- HAWORTH JC, BOOTH FA, CHUDLEY AE et al. Phenotypic variability in glutaric aciduria type I: Report of fourteen cases in five Canadian Indian kindreds. **J. Pediatr.** v. 118, p. 52-8, 1991.
- HERKERT M, ROTTGER S, BECKER CM. The NMDA receptor subunit NR2B of neonatal rat brain: complex formation and enrichment in axonal growth cones. **Eur. J. Neurosci.** v. 10, p. 1553-62, 1998.
- HERSCHKOWITZ N. **Inborn errors of metabolism affecting brain development.** Introduction. In: Inborn errors of metabolism in humans. Lancaster, MTP Press Limited, p.157-60, 1982.
- HEYES MP. Hypothesis: a role for quinolinic acid in the neuropathology of glutaric aciduria type I. **Can. J. Neurol. Sci.** v. 14, p. 441-3, 1987.
- HOFFMANN GF, VON KRIES R, KLOSE D et al. Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fattyacid transport and oxidation in Germany. **Eur. J. Pediatr.** v. 163, p. 76-80, 2004.
- HOFFMANN GF, ZSCHOCKE J. Glutaric Aciduria Type I: from clinical, biochemical and molecular diversity to successful therapy. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 22, p. 381-391, 1999.

- HOFFMANN GF. **Organic Acid Analysis**. In Blau., N., Duran, M., Blaskovics, M.E. Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Disease., 1st ed., London, Chapman and Hall, 31-49. 1996.
- HOFFMANN GF, ATHANASSOPOULOS S, BURLINA AB et al. Clinical course, early diagnosis, treatment, and prevention of disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Neuropediatrics**. v. 27, p. 115-23, 1996.
- HOFFMANN GF, BOHLES HJ, BURLINA A et al. Early signs and course of disease of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 18, p. 173-6, 1995.
- HOFFMANN GF, GIBSON KM, TREFZ FK et al. Neurological manifestations of organic acid disorders. **Eur. J. Pediatr.** v. 153, p. S94-100, 1994.
- HOFFMANN GF. Selective screening for inborn errors of metabolism – past, present and future. **Eur. J. Pediatr.** v. 153, p. S2-S8, 1994.
- HOFFMANN GF, SEPPEL CK, HOLMES B et al. Quantitative organic acid analysis in cerebrospinal fluid and plasma: reference values in a pediatric population. **J. Chromatogr.** v. 617, p. 1-10, 1993a.
- HOFFMANN GF, MEIER-AUGENSTEIN W, STOCKLER S et al. Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluid. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 16, p. 648-69, 1993b.
- HOFFMANN GF, TREFZ FK, BARTH P et al. Glutaril-CoA Deficiency: a distinct encephalopathy. **Pediatrics**. v. 88, p. 1194-1203, 1991.
- HUGHES BP. A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. **Clin. Chim. Acta.** v. 7, p. 597-603, 1962.
- HYMAN DB, TANAKA K. Specific glutaryl-CoA dehydrogenating activity is deficient in cultured fibroblasts from glutaric aciduria patients. **J. Clin. Invest.** v. 73, p. 778-84, 1984.
- KALDIS P, STOLZ M, WYSS M et al. Identification of two distinctly localized mitochondrial creatine kinase isoenzymes in spermatozoa. **J. Cell. Sci.** v. 109, p. 2079-2088, 1996.
- KOELLER DM, SAUER S, WAJNER M et al. Animal models for glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 27, p. 813-8, 2004.

- KOELLER DM, WOONTNER M, CRNIC LS et al. Biochemical, pathologic and behavioral analysis of a mouse model of glutaric acidemia type I. **Hum. Mol. Genet.** v. 11, p. 347-57, 2002.
- KÖLKER S, KOELLER DM, OKUN JG et al. Pathomechanisms of neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Ann. Neurol.** v. 55, p. 7-12, 2004.
- KÖLKER S, OKUN JG, AHLEMEYER B et al. Chronic treatment with glutaric acid induces partial tolerance to excitotoxicity in neuronal cultures from chick embryo telencephalons. **J. Neurosci. Res.** v. 68, p. 424-31, 2002a.
- KÖLKER S, OKUN JG, AHLEMEYER B et al. Ca²⁺ and Na⁺ dependence of 3-hydroxyglutarate-induced excitotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. **Pediatr. Res.** v. 52, p. 199-206, 2002b.
- KÖLKER S, AHLEMEYER B, HUHNE R et al. Potentiation of 3-hydroxyglutarate neurotoxicity following induction of astrocytic iNOS in neonatal rat hippocampal cultures. **Eur. J. Neurosci.** v. 13, p. 2115-22, 2001b.
- KÖLKER S, AHLEMEYER B, KRIEGLSTEIN J et al. Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons. **Pediatr. Res.** v. 50, p. 76-82, 2001a.
- KÖLKER S, AHLEMEYER B, KRIEGLSTEIN J et al. Evaluation of trigger factors of acute encephalopathy in glutaric aciduria type I: fever and tumour necrosis factor-alpha. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 23, p. 359-62, 2000b.
- KÖLKER S, AHLEMEYER B, KRIEGLSTEIN J et al. Maturation-dependent neurotoxicity of 3-hydroxyglutaric and glutaric acids in vitro: a new pathophysiologic approach to glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Pediatr. Res.** v. 47, p. 495-503, 2000a.
- KÖLKER S, AHLEMEYER B, KRIEGLSTEIN J et al. 3-Hydroxyglutaric and glutaric acids are neurotoxic through NMDA receptors in vitro. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 22, p. 259-62, 1999.
- KOSINSKI CM, STANDAERT DG, TESTA CM et al. Expression of metabotropic glutamate receptor 1 isoforms in the substantia nigra pars compacta of the rat. **Neuroscience.** v. 86, p. 783-98, 1998.

- LATINI A, SCUSSIATO K, ROSA RB et al. Promotion of oxidative stress by 3-hydroxyglutaric acid in rat striatum. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 28, p. 57-67, 2005.
- LATINI A, BORBA ROSA R, SCUSSIATO K et al. 3-Hydroxyglutaric acid induces oxidative stress and decreases the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats. **Brain. Res.** v. 956, p. 367-73, 2002.
- LEIBEL RL, SHIH VE, GOODMAN S et al. Glutaric acidemia: a metabolic disorder causing progressive choreoathetosis. **Neurology.** v. 30, p. 1163-8, 1980.
- LIESERT M, ZSCHOCKE J, HOFFMANN GF et al. Biochemistry of glutaric aciduria type I: activities of in vitro expressed wild-type and mutant cDNA encoding human glutaryl-CoA dehydrogenase. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 22, p. 256-8, 1999.
- LIMA TT, BEGNINI J, DE BASTIANI J et al. Pharmacological evidence for GABAergic and glutamatergic involvement in the convulsant and behavioral effects of glutaric acid. **Brain. Res.** v. 802, p. 55-60, 1998.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUDOLPH AC, HE F, SPENCER PS et al. 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. **Can. J. Neurol. Sci.** v. 18, p. 492-8, 1991.
- LUND TM, CHRISTENSEN E, KRISTENSEN AS et al. On the neurotoxicity of glutaric, 3-hydroxyglutaric, and trans-glutaconic acids in glutaric acidemia type I. **J. Neurosci. Res.** v. 77, p. 143-7, 2004.
- MANOS P, BRIAN GK, EDMOND J. Creatine kinase activity in postnatal rat brain development and in cultured neurons, astrocytes and oligodendrocytes. **J. Neurochem.** v. 56, p. 2101-2107, 1991.
- MARKS DB, MARKS AD, SMITH C. M. **Basic Medical Biochemistry, A Clinical Approach.** Lippincott Williams & Wilkins, 1996.
- MAYATEPEK E, HOFFMANN GF, BAUMGARTNER R et al. Atypical vitamin B₁₂-unresponsive methylmalonic aciduria in a sibship with severe progressive encephalomyopathy: a new genetic disease? **Eur. J. Pediatr.** v. 155, p. 398-403, 1996.
- MCMILLAN TA, GIBSON KM, SWEETMAN L et al. Conservation of central nervous system glutaryl-coenzyme A dehydrogenase in fruit-eating bats with

glutaric aciduria and deficient hepatic glutaryl-coenzyme A dehydrogenase. **J. Biol. Chem.** v. 263, p. 17258-61, 1988.

- MERINERO B, PEREZ-CERDA C, FONT LM et al. Variable clinical and biochemical presentation of seven Spanish cases with glutaryl-CoA-dehydrogenase deficiency. **Neuropediatrics.** v. 26, p. 238-42, 1995.
- MOLLOY GR, WILSON CD, BENFIELD P. et al. Rat brain creatine kinase messenger RNA levels are high in primary cultures of brain astrocytes and oligodendrocytes and low in neurons. **J. Neurochem.** v. 59, p. 1932-1952, 1992.
- MUHLHAUSEN C, ERGUN S, STRAUSS KA et al. Vascular dysfunction as an additional pathomechanism in glutaric aciduria type I. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 27, p. 829-34, 2004.
- NELSON DL, COX MM. **Lehninger, Principles of Biochemistry.** 4^a ed. New York: Worth Publishers, 2004.
- NELSON DL, COX MM. **Lehninger, Principles of Biochemistry.** 3^a ed. New York: Worth Publishers, 2000.
- OLPIN SE, POLLITT RJ, MCMENAMIN J et al. 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency in a 23-year-old man. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 25, p. 477-82, 2002.
- OYEDOTUN KS, LERNIRE BD. The *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase anchor subunit, SDH4p: mutations at the C-terminal Lys-132 perturb the hydrofobic domain. **Bioch. Bioph. Acta.** v. 1411, p. 170-179, 1999.
- PINEDA M, RIBES A, BUSQUETS C et al. Glutaric aciduria type I with high residual glutaryl-CoA dehydrogenase activity. **Dev. Med. Child. Neurol.** v. 40, p. 840-2, 1998.
- PORCIUNCULA LO, EMANUELLI T, TAVARES RG et al. Glutaric acid stimulates glutamate binding and astrocytic uptake and inhibits vesicular glutamate uptake in forebrain from young rats. **Neurochem. Int.** v. 45, p. 1075-86, 2004.
- PORCIUNCULA LO, DAL-PIZZOL A JR, COITINHO AS et al. Inhibition of synaptosomal [3H]glutamate uptake and [3H]glutamate binding to plasma membranes from brain of young rats by glutaric acid in vitro. **J. Neurol. Sci.** v. 173, p. 93-6, 2000

- RASHED M, OZAND PT, AQEEL A et al. Experience of King Faisal Specialist Hospital and Research Center with organic acid disorders. **Brain. Develop.** v. 16, p. 1-6, 1994.
- RESINK A, VILLA M, BENKE D et al. Characterization of agonist-induced down-regulation of NMDA receptors in cerebellar granule cell cultures. **J. Neurochem.** v. 66, p. 369-77, 1996.
- ROSA RB, SCHWARZBOLD C, DALCIN KB et al. Evidence that 3-hydroxyglutaric acid interacts with NMDA receptors in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of young rats. **Neurochem. Int.** v. 45, p. 1087-94, 2004.
- RUSTIN P, CHRETIEN D, BOURGERON T. et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. **Clin. Chim. Acta.** v. 228, p. 35-51, 1994.
- SCHAPIRA AH, COOPER JM, DEXTER D et al. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **J. Neurochem.** v. 54, p. 823-827, 1990.
- SCRIVER CR, BEAUDET AL, SKY WS et al. (Eds). **The metabolic and molecular bases of inherited disease.** 8. ed. New York: McGraw-Hill, p. 3-45, 2001.
- SILVA CG, SILVA AR, RUSCHEL C et al. Inhibition of energy production in vitro by glutaric acid in cerebral cortex of young rats. **Metab. Brain. Dis.** v. 15, p. 123-31, 2000.
- SINCLAIR LA. A new look at the inborn errors of metabolism. **Ann. Clin. Biochem.** v. 19, p. 314-21, 1982.
- SOBOLL S, BRDICZKA D, JAHNKE D et al. Octamer-dimer transitions of mitochondrial creatine kinase in heart disease. **J. Mol. Cell. Cardiol.** v. 31, p. 857-66, 1999.
- STACHOWIAK O, DOLDER M, WALLIMANN T et al. Mitochondrial creatine kinase is a prime target of peroxynitrite-induced modification and inactivation. **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 16694-16699, 1998.
- STANDAERT DG, TESTA CM, YOUNG AB et al. Organization of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor gene expression in the basal ganglia of the rat. **J. Comp. Neurol.** v. 343, p. 1-16, 1994.
- STOKKE O, GOODMAN SI, MOE PG. Inhibition of brain glutamate decarboxylase by glutarate, glutaconate, and beta-hydroxyglutarate:

explanation of the symptoms in glutaric aciduria? **Clin. Chim. Acta.** v. 66, p. 411-5, 1976.

- STRAUSS KA, MORTON DH. Type I glutaric aciduria, part 2: a model of acute striatal necrosis. **Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.** v. 121, p. 53-70, 2003.
- STUTCHFIELD P, EDWARDS MA, GRAY RG et al. Glutaric aciduria type I misdiagnosed as Leigh's encephalopathy and cerebral palsy. **Dev. Med. Child. Neurol.** v. 27, p. 514-8, 1985.
- SUPERTI-FURGA A, HOFFMANN GF. Glutaric aciduria type 1 (glutaryl-CoA-dehydrogenase deficiency): advances and unanswered questions. Report from an international meeting. **Eur. J. Pediatr.** v. 156, p. 821-8, 1997.
- SWEETMANN, L. **Organic acid analysis.** In: Hommes, FA (ed.) Techniques in diagnostic human biochemical genetics. A laboratory manual. 1a ed. New York: Wiley-Liss; 143-176. 1995.
- ULLRICH K, FLOTT-RAHMEL B, SCHLUFF P et al. Glutaric aciduria type I: pathomechanisms of neurodegeneration. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 22, p. 392-403, 1999.
- VARADKAR S, SURTEES R. Glutaric aciduria type I and kynurenine pathway metabolites: a modified hypothesis. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 27, p. 835-42, 2004.
- VICARIO, C.; ARIZMENDI, C.; MALLOCH, G. D. A. et al. Lactate utilization by isolated cells from early neonatal rat brain. **J. Neurochem.** v. 57, p. 1700-1707, 1991.
- VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry.** New York: John Wiley & Sons, 1990.
- WAJNER M, KÖLKER S, SOUZA DO et al. Modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **J. Inherit. Metab. Dis.** v. 27, p. 825-8, 2004.
- WHETSELL WO. The use of organotypic tissue culture for study of amino acid neurotoxicity and its antagonism in mammalian CNS. **Clin. Neuropharmacol.** v. 7, p. 452, 1984.
- WHETSELL WO JR, SCHWARCZ R. The organotypic tissue culture model of corticostriatal system used for examining amino acid neurotoxicity and its

antagonism: studies on kainic acid, quinolinic acid and (-) 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid. **J. Neural. Transm. Suppl.** v. 19, p. 53-63, 1983.

- WOONTNER M, CRNIC LS, KOELLER DM. Analysis of the expression of murine glutaryl-CoA dehydrogenase: in vitro and in vivo studies. *Mol. Genet. Metab.* v.69, p. 116-22, 2000.
- WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and Creatinine Metabolism. **Physiol. Rev.** v. 80, p. 1107-1213, 2000.
- ZIADEH R, HOFFMAN EP, FINEGOLD DN et al. Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Pennsylvania: neonatal screening shows high incidence and unexpected mutation frequencies. **Pediatr. Res.** v. 37, p. 675-8, 1995.
- ZSCHOCKE J, QUAK E, GULDBERG P et al. Mutation analysis in glutaric aciduria type I. **J. Med. Genet.** v. 37, p. 177-81, 2000.